

**Reorganisation der kardialen extrazellulären  
Matrix und Reexpression fetaler Molekülvarianten  
von Fibronectin und Tenascin-C bei  
kardiovaskulären Erkrankungen**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der  
Friedrich-Schiller Universität Jena

von Dr. med. univ. Anja Baldinger

geboren am 07.08.1982 in Vöcklabruck, Österreich

**Gutachter:**

- 1. Prof. Dr. Alexander Berndt, Institut für Pathologie, Uniklinikum Jena**
- 2. Prof. Dr. Hans Reiner Figulla, Klinik für Innere Medizin I, Uniklinikum Jena**
- 3. Priv. Doz. Dr. Torsten Hansen, Institut für Pathologie, Uniklinikum Mainz**

**Tag der öffentlichen Verteidigung:      07.02.2012**

## Abkürzungsverzeichnis

AS	Aortenklappenstenose
ASMA	Alpha-glattmuskuläres Aktin
cECM	kardiale extrazelluläre Matrix
COL1A1	Kollagen Typ I Alpha 1
CTGF	<i>connective tissue growth factor</i>
cLSM	konfokale <i>Laser Scanning Microscopy</i>
ECM	extrazelluläre Matrix
Fn	Fibronektin
HLM	Herz-Lungen-Maschine
KHK	koronare Herzkrankheit
MIDCAB	<i>minimal invasive direct coronary artery bypass</i>
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
OPCAB	<i>off pump coronary artery bypass</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
SIP	<i>small immunoprotein</i>
TGF- $\beta$	<i>tissue growth factor beta</i>
Tn-C	Tenascin C
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
VSMC	<i>vascular smooth muscle cell</i>

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>5</b>
<b>2.1.</b>	<b>ERKRANKUNGEN DES KARDIOVASKULÄREN SYSTEMS .....</b>	<b>5</b>
2.1.1.	Definition und Epidemiologie .....	5
2.1.2.	Aortenklappenstenose und valvuläre Kardiomyopathie .....	6
2.1.3.	Koronare Herzerkrankung und ischämische Kardiomyopathie .....	8
<b>2.2.</b>	<b>DIE EXTRAZELLULÄRE MATRIX DES HERZENS.....</b>	<b>9</b>
2.2.1.	Zusammensetzung und Funktion der kardialen extrazellulären Matrix .	9
2.2.2.	Die Rolle der extrazelluläre Matrix in der Organogenese des Herzens .....	10
2.2.3.	Bedeutung der extrazellulären Matrix im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen .....	11
<b>2.3.</b>	<b>DIE ZELLULÄREN ADHÄSIONSPROTEINE FIBRONEKTIN UND TENASCIN-C .....</b>	<b>13</b>
2.3.1.	Fibronectin.....	13
2.3.1.1.	Die Bedeutung von Fibronectin für die Herzentwicklung und im Rahmen des myokardialen Gewebe- <i>Remodelling</i> .....	15
2.3.2.	Tenascin-C .....	16
2.3.3.	Humane rekombinante Antikörper gegen Fibronectin- und Tenascin-C- <i>Splicing</i> -Varianten – potentielle Bedeutung für zielgerichtete Therapie struktureller myokardialer Erkrankungen .....	19
<b>2.4.</b>	<b>ZIELSTELLUNG .....</b>	<b>21</b>

<b>3 ORIGINALARBEIT .....</b>	<b>23</b>
Comparative analysis of oncofetal fibronectin and tenascin-C expression in right atrial auricular and left ventricular human cardiac tissue from patients with coronary artery disease and aortic valve stenosis. Baldinger A, Brehm BR, Richter P, Bossert T, Gruen K, Hekmat K, Kosmehl H, Neri D, Figulla HR, Berndt A, Franz M. Histochem Cell Biol 135: 427-41, 2011 .....	
	23
<b>4 DISKUSSION.....</b>	<b>24</b>
<b>4.1. HISTOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN.....</b>	<b>24</b>
<b>4.2. ECM - GENEXPRESSIONSANALYSE.....</b>	<b>25</b>
<b>4.3. mRNA-EXPRESSION UND PROTEINDEPOSITION VON ED-A<sup>+</sup> FIBRONEKTIN UND A1<sup>+</sup> TENASCIN-C .....</b>	<b>28</b>
<b>4.4. SCHLUSSFOLGERUNGEN .....</b>	<b>35</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>37</b>
<b>ANLAGEN</b>	

# 1 Zusammenfassung

### Hintergrund und Zielstellung:

Kardiovaskuläre Erkrankungen wie die koronare Herzerkrankung (KHK) oder die Aortenklappenstenose (AS) gehen mit Umbauvorgängen des myokardialen Gewebes und insbesondere mit einer strukturellen und funktionellen Reorganisation der kardialen extrazellulären Matrix (ECM) einher. Dabei kommt es unter anderem zu einer Reexpression von onkofetalen Fibronectin- und Tenascin-C-*Splicing*-Varianten, welche im gesunden Myokardgewebe nicht vorkommen. Die Verfügbarkeit humaner rekombinanter Antikörper gegen diese speziellen Matrix-Moleküle eröffnet neue Möglichkeiten zielgerichteter Diagnose- und Therapiestrategien.

Ziel der vorliegenden Arbeit war eine vergleichende Analyse des histologischen Schädigungsgrades, der ECM-Reorganisation sowie der Reexpression von ED-A<sup>+</sup> Fibronectin und A1<sup>+</sup> Tenascin-C in Gewebeproben des rechten Vorhofohrs sowie des linksventrikulären Septums von Patienten mit Aortenklappenstenose oder Aortenklappenstenose in Kombination mit koronarer Herzerkrankung. Der Schwerpunkt der Untersuchungen lag dabei insbesondere auf dem intra-individuellen Vergleich zwischen rechtem Vorhofohr und linkem Ventrikel.

### Methoden:

Gewebeproben aus dem rechten Vorhofohr sowie dem linksventrikulärem Septum von 30 Patienten (davon 17 mit Aortenklappenstenose und 13 mit Aortenklappenstenose und koronarer Herzerkrankung) wurden zunächst im Hinblick auf histologische Veränderungen anhand eines definierten Scoring-Systems unter Einbeziehung der interstitiellen Fibrose und der kardiomyozytären Schädigung untersucht. Des Weiteren erfolgten rt-PCR basierte Gen-Expressions-Analysen von 84 ECM- und Adhäsionsmolekülen. Schließlich wurde die Reexpression von ED-A<sup>+</sup> Fibronectin (ED-A<sup>+</sup> Fn) und A1<sup>+</sup>Tenascin-C (A1<sup>+</sup> Tn-C) sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene untersucht. Die Analyse der Proteindepositionen der beiden Moleküle erfolgte mittels Immunfluoreszenztechnik unter Einsatz humanen rekombinanter small immunoiprotein (SIP) – Format- Antikörper mit Verwendbarkeit als Vehikel für einen zielgerichteten Transfer diagnostischer oder therapeutischer Agenzien.

### **Ergebnisse:**

Die intra-individuell vergleichende Analyse des histologischen Schädigungsgrades zwischen rechtem Vorhofohr und linksventrikulären Septum zeigte eine signifikante positive Korrelation ( $r=0,695$ ). Die Genexpressionslevel der Mehrheit der 84 untersuchten ECM-Moleküle zeigten in Gewebeproben aus dem linken Ventrikel deutlich höhere Werte verglichen mit den korrespondierenden Proben aus dem rechten Vorhofohr. Für 24 Gene konnte im Vergleich zu histologisch unauffälligen Proben eine relevante ( $>2,5$ -fache) Hoch- oder Herunterregulation in rechtem Vorhofohr und linkem Ventrikel nachgewiesen werden. Unter Verwendung von humaner SIP-Antikörper konnte für ED-A<sup>+</sup> Fn eine signifikante positive Korrelation der Proteindepositionslevel in rechtem Vorhofohr und linkem Ventrikel demonstriert werden ( $r=0,818$ ).

### **Schlussfolgerung:**

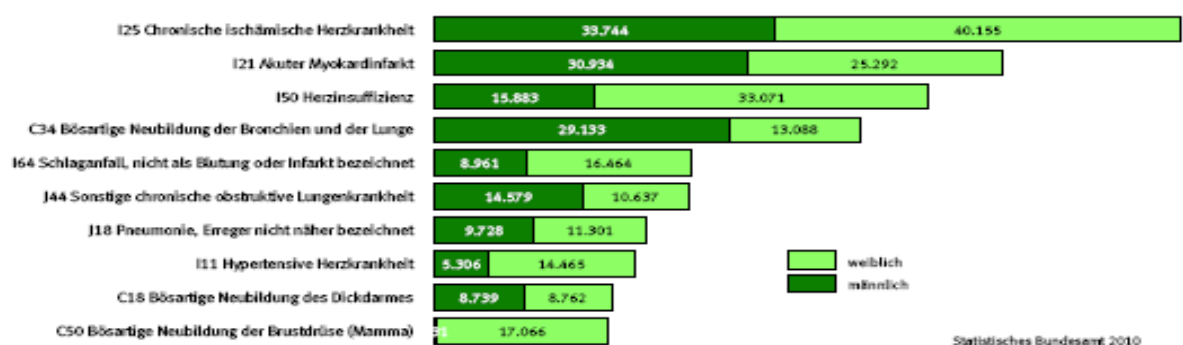
Das im Rahmen verschiedener Herzerkrankungen wie Aortenklappenstenose oder koronare Herzerkrankung stattfindende myokardiale Gewebe-*Remodelling* ist offensichtlich ein das gesamte Organ einbeziehender Prozess. So konnte gezeigt werden, dass sowohl histologische Veränderungen als auch Umbauprozesse der ECM, insbesondere die Reexpression von ED-A<sup>+</sup> Fn und A1<sup>+</sup> Tn-C, nicht nur Regionen betreffen, welche unmittelbar einer Druckbelastung oder chronischen Ischämie ausgesetzt sind. Die intra-individuell vergleichende Analyse von rechtem Vorhofohr und linkem Ventrikel offenbarte gleichsinnige Veränderungen des histologischen Schädigungsgrades und auch des ECM-*Remodelling*. ED-A<sup>+</sup> Fn konnte als exzellente molekulare Zielstruktur für einen antikörperbasierten Transfer diagnostischer oder therapeutischer Substanzen unter Verwendung eines humanen rekombinanten SIP-Antikörper identifiziert werden. Darüber hinaus qualifiziert sich das rechte Vorhofohr, welches bei kardiochirurgischen Eingriffen unter Verwendung der extrakorporalen Zirkulation zur Verfügung steht, als repräsentatives diagnostisches *Tool* zur Abschätzung des histologischen Schädigungsgrades und des ECM-Reorganisationslevels des Gesamtorgans. Hieraus könnten sich perspektivisch neue Optionen im Sinne einer individualisierten Diagnostik und Therapieplanung ergeben.

## 2 Einleitung

### 2.1. Erkrankungen des kardiovaskulären Systems

#### 2.1.1. Definition und Epidemiologie

Die Gruppe der Herz-Kreislauf-Erkrankungen umfasst sämtliche den Herzmuskel und die Blutgefäße betreffenden Pathologien. Kardiovaskuläre Erkrankungen sind in westlichen Industriestaaten nach wie vor für den Großteil der Todesfälle verantwortlich. Laut des statistischen Bundesamtes belegten 2009 die chronische ischämische Herzkrankheit und der akute Myokardinfarkt die Plätze 1 und 2 der Todesursachenstatistik in Deutschland, gefolgt von der Herzinsuffizienz auf Platz 3 (Statistische Bundesamt, Wiesbaden 2011, **Abbildung 1**).



**Abbildung 1:** Häufigste Todesursachen in Deutschland 2009 (Statistisches Bundesamt Deutschland 2011)

Herz-Kreislauf-Erkrankungen zeichnen sich aufgrund ihrer hohen Prävalenz für einen erheblichen Teil der Morbidität und Mortalität sowie der Kosten im Gesundheitssystem verantwortlich. In Hinblick darauf ist neben der Etablierung von Präventivmaßnahmen und der Verbesserung der Akutversorgung von Patienten mit Myokardinfarkten ein wichtiges Forschungsziel die Prophylaxe und Therapie von Spätfolgen der koronaren Herzerkrankung ebenso wie der hypertensiven und valvulären Kardiomyopathie.



Häufiges klinisches Korrelat dieser Erkrankungen ist die Herzinsuffizienz, also das Unvermögen des Herzens bei Belastung (Belastungsinsuffizienz) oder schon in Ruhe (Ruheinsuffizienz) den für den Stoffwechsel erforderlichen Blutauswurf aufzubringen (Vorwärtsversagen) bzw. den venösen Rückfluss aufzunehmen (Rückwärtsversagen). Stadienabhängig kommt es dabei zu Veränderungen des linken Ventrikels mit linksventrikulärer Dilatation und Dysfunktion.

Infolge einer Linksherzinsuffizienz kommt es zur Lungenstauung bis hin zu Lungenödem, Pleuratrassudat und pulmonaler Hypertonie mit Dyspnoe als klinisches Hauptsymptom sowie zur verminderten Auswurfleistung mit infolgedessen Abnahme des Herzminutenvolumens und dadurch eingeschränkter Leistungsfähigkeit. Sekundär infolge einer Linksherzinsuffizienz oder als eigenständiges Krankheitsbild bei rechtsventrikulären Erkrankungen kommt es zur Rechtsherzinsuffizienz mit Rückstau von Blut in die Körpervenen. Durch den erhöhten Venendruck entwickelt sich eine Wasseransammlung in den Geweben mit Ödemen insbesondere der Beine, Auftreten von Aszites, Pleura- und Perikarderguß, Stauungsgastritis und Stauungsmilz.

Die chronische Herzinsuffizienz weist stadienabhängig nach einem individuellen Krankheitsverlauf über Wochen bis Jahre eine hohe Sterblichkeit von 20-30% pro Jahr auf (Niemenin et al. 2005). Trotz der genannten unterschiedlichsten Ätiologien der Herzinsuffizienz ist es eine anerkannte Tatsache, dass es zu fortschreitenden Veränderungen von Größe, Form und Funktion des Herzens, dem sogenannten myokardialen *Remodelling* kommt. Dieser sowohl bei ischämischen als auch bei valvulären oder hypertensiven Herzerkrankungen zu beobachtende Prozess determiniert den Verlauf der Erkrankung und damit die Individualprognose des Patienten (Cohn et al. 2000).

### **2.1.2. Aortenklappenstenose und valvuläre Kardiomyopathie**

Die häufigste erworbene Herzklappenerkrankung beim Erwachsenen in Mitteleuropa ist die Aortenklappenstenose. Pathogenetisch liegt dieser eine Kalzifizierung zugrunde, welche sich in der Regel von der Klappenbasis zu den Segelspitzen ausbreitet und schließlich zur strukturellen Klappendegeneration

führt. Dadurch kommt es zu einer verminderten Klappenbeweglichkeit mit Einschränkung der Öffnungsfläche. Um den folglich erhöhten Druckgradienten zu überwinden und das Herzzeitvolumen aufrechterhalten zu können, entwickelt sich eine kompensatorische Hypertrophie des linken Ventrikels. Es handelt sich dabei um die klassischerweise infolge von Druckbelastung auftretende konzentrische Form der Linksventrikelhypertrophie. In der Folge entsteht eine diastolische Relaxationsstörung mit konsekutiv erhöhtem linksventrikulärem Füllungsdruck. Die primär hypertrophiebedingte Störung der Dehnbarkeit wird im Rahmen des Fortschreitens der Erkrankung durch eine relative Koronarinsuffizienz mit zunehmender Fibrosierung des Myokards verstärkt. Kann die hypertrophierte linke Herzkammer die chronische Druckbelastung nicht mehr kompensieren, so kommt es zur Dilatation und letztlich eine Abnahme der systolischen Funktion.

In der Regel bleiben Patienten mit einer Aortenklappenstenose lange symptomfrei, die typischen Symptome in der Endphase der Erkrankung sind Belastungsdyspnoe, Angina pectoris, Schwindel und Synkopen. Mit Auftreten von Symptomen verschlechtert sich auch die Prognose dramatisch: die mittlere Lebenserwartung beträgt dann nur noch 2-3 Jahre mit einem hohen Risiko für einen plötzlichen Herztod, während man bei asymptomatischen Patienten von einer ähnlichen Prognose wie bei altersentsprechenden Menschen ohne Aortenklappenstenose ausgeht (Vahanian et al. 2007).

Somit ist beim Auftreten von Herzinsuffizienzsymptomen, belastungsinduzierter Angina pectoris oder Synkopen die Indikation zum raschen Aortenklappenersatz gegeben. Neben einem konventionellen operativen Aortenklappenersatz unter Einsatz einer Herz-Lungen-Maschine kommen bei Patienten mit hohem perioperativem Risiko seit wenigen Jahren auch interventionelle Klappenersatzverfahren mit von transfemoral oder von apikal implantierbaren Bioprothesen zur Anwendung (Kodali et al. 2011, Zahn et al. 2011, Figulla et al. 2011). Die Ballonvalvuloplastie wird aufgrund der hohen Restenoserate nur noch als Überbrückung vor geplantem Klappenersatz bei hämodynamisch instabilen Patienten angewendet (Bonow et al. 2008).

### **2.1.3. Koronare Herzerkrankung und ischämische Kardiomyopathie**

Die koronare Herzkrankheit (KHK) wird in der Regel durch Arteriosklerose verursacht, wobei es durch Ablagerungen in den Gefäßwänden zu einer Versteifung sowie einer zunehmenden Verminderung des Gefäßquerschnitts kommt. Folge davon ist eine Beeinträchtigung der Durchblutung und damit eine verminderte Sauerstoffversorgung, sodass ein Missverhältnis zwischen Sauerstoffbedarf und Sauerstoffangebot am Herzmuskel entsteht, welches als Ischämie oder als Koronarinsuffizienz bezeichnet wird.

Die Prävalenz der koronaren Herzerkrankung ist bei Männern höher als bei Frauen und nimmt mit steigendem Lebensalter zu. Während in der Altersgruppe von 55-64 Jahren 13,1% der Männer und 8,4% der Frauen betroffen sind, steigt der Anteil Erkrankter in der Altersgruppe der über 75-jährigen auf 18,6% der Männer und 16,1% der Frauen an (American Heart Association 2005). Obwohl epidemiologische Untersuchungen wie die Framingham-Studie bereits vor langer Zeit kardiovaskuläre Risikofaktoren, als wichtigste arterielle Hypertonie, Dyslipidämie, Diabetes mellitus, Rauchen, Adipositas und genetische Disposition, identifiziert haben, ist die Pathogenese der arteriosklerotischen Gefäßveränderungen bis heute nur unzureichend verstanden. Klassischerweise wurde die Speicherung von Lipiden in der Gefäßwand als essentieller pathogenetischer Initialprozess betrachtet (D'Agostino et al. 2000). Heute geht man davon aus, dass insbesondere ein Ungleichgewicht pro- und antiinflammatorischer Mechanismen in der Pathophysiologie der Arteriosklerose von Bedeutung ist (Libby und Theroux 2005).

Typische Symptome einer koronaren Herzkrankheit sind Angina pectoris sowie belastungsinduzierte Dyspnoe als Anginaäquivalent. Des Weiteren können Herzrhythmusstörungen als Folge einer akuten oder chronischen Myokardischämie auftreten. Die KHK ist neben der hypertensiven Herzkrankheit außerdem die wichtigste Ursache der Entwicklung einer Herzinsuffizienz. Getriggert durch chronische Ischämie kommt es zu progredienter interstitieller und perivaskulärer Fibrosierung des Myokard (Beltrami et al. 1994). Unter anderem durch vermehrte Deposition sowie erhöhte Quervernetzung von

Kollagenen entsteht eine Zunahme des interstitiellen Kompartiments (Brilla und Maisch 1994).

Neben einer Lebensstilmodifikation und medikamentösen Therapie der KHK sollte immer eine komplette Revaskularisierung ischämischer Areale mittels perkutaner Intervention oder Bypassoperation angestrebt werden. Die technischen Fortschritte in der perkutanen transluminale Koronarangioplastie haben zu einer Ausweitung der Indikationsstellung geführt, da mittlerweile auch komplexe und anatomisch schwer zugängliche Koronarstenosen sicher interventionell angegangen werden können (Wijns et al. 2010). Doch auch minimal-invasive Bypassverfahren (MIDCAB) und/oder Eingriffe ohne Einsatz der Herz-Lungen-Maschine (OPCAB) finden zunehmend Anwendung unter dem Aspekt, dass die Rate nichtkardialer Komplikationen vermindert wird (Karpuzoglu et al. 2009).

## **2.2. Die extrazelluläre Matrix des Herzens**

### **2.2.1. Zusammensetzung und Funktion der kardialen extrazellulären Matrix**

Innerhalb des Herzmuskelgewebes nehmen zwar Kardiomyozyten mehr als zwei Drittel des Volumens ein, 70% der Zellen im Myokard sind allerdings Fibroblasten (Banerjee et al. 2007). Deren Aufgabe besteht insbesondere in der Synthese der ECM-Bestandteile und der Regulation des Umsatzes derselben, zum Beispiel durch die Abgabe und Aktivierung proteolytischer Enzyme (Pelouch et al. 1993). Nachdem die extrazelluläre Matrix traditionell als banales Strukturgerüst für die zellulären Komponenten, nämlich Myozyten, Fibroblasten und Endothelzellen sowie Stamm- und Progenitorzellen betrachtet wurde, ist man heute zu der Erkenntnis gelangt, dass die kardiale extrazelluläre Matrix (cECM) eine dynamische Struktur mit hoher funktioneller und struktureller Diversität ist. Die cECM steuert grundlegende zelluläre Prozesse wie Zellmigration, -differenzierung und -proliferation (Lukashev und Werb 1998). Im gesunden Myokard erhält die cECM außerdem die strukturelle Stabilität sowie die Myozytengeometrie und ermöglicht die Kraftübertragung zwischen den Myozyten (Weber 1989).

Zu den Hauptbestandteilen der ECM zählen strukturelle Proteine wie die Kollagene und Elastin, adhäsive oder anti-adhäsive Moleküle wie Fibronectin, Tenascin-C, Vitronectin oder Laminin, Proteoglykane wie Versican und Decorin sowie Hyaluronsäure (Hein und Schaper 2001). Die Zusammensetzung der cECM ist insbesondere durch eine Gruppe von proteolytischen Enzymen, den Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) sowie ihren endogenen Inhibitoren (TIMPs) streng reguliert, sodass die Synthese von Matrix-Komponenten und der Abbau derselben in einem dynamischen Gleichgewicht stehen (Spinale 2007). Schon ein geringes Missverhältnis kann zur Beeinträchtigung einer Reihe an zellulären Prozessen und somit zur Funktionseinschränkung führen. Die Bedeutung der ECM in Hinblick auf den Erhalt der myokardialen Funktion konnte zum Beispiel in Studien von Mujumdar und Mitarbeitern demonstriert werden: durch Plasmin und Aktivierung von MMPs wurde die ECM-Zusammensetzung verändert, was zu einer Beeinträchtigung der systolischen Funktion trotz erhaltener Myozytenkontraktilität führte (Mujumdar et al. 2001).

### **2.2.2. Die Rolle der extrazelluläre Matrix in der Organogenese des Herzens**

Während der Herzentwicklung tragen chemische und mechanische Signale aus der ECM essentiell dazu bei, dass die Zellmigration und-transformation in einer spezifischen räumlich-zeitlichen Abfolge vonstatten gehen (Bowers et al. 2010). Der aus Fusion der beiden Endokardschläuche gebildete embryonale Herzschauch besteht aus einer Endothelzellschicht umgeben von myokardialen Zellen mit einer azellulären Matrix bestehend aus Proteoglykanen, Kollagenen und Glykoproteinen zwischen den inneren Endothelschichten. Die Matrix dient dazu, die Schlauchstruktur aufrecht zu erhalten und den Ablauf der embryonalen Herzentwicklung zu regulieren (Huang et al. 1995). Der Herzschauch krümmt sich im Weiteren zur Herzschleife und die Herzhöhlen beginnen sich zu formieren. Nach Bildung der Herzschleife entstehen Endokardkissen aus einer lokalisierten Ausweitung der ECM im Bereich des AV-Kanals und des ventrikulären Ausflusstraktes aus differenzierten Endothelzellen. Stimuli ausgehend von den Myozyten und der umgebenden ECM regen die Endothelzellen zur Transformation und zur Invasion in das

umgebende Mesenchym und die ECM an. Dieser auch endothelial-mesenchymale Transition genannte Vorgang ist unter anderem essentiell für die Valvulogenese sowie Ausbildung des Septums (Eisenberg und Markwald 1995). Hierbei spielen vor allem der Wachstumsfaktor TGF- $\beta$ 1 und sein entsprechender Rezeptor eine wichtige Rolle (Sridurongrit 2008). Ein weiterer ECM-Bestandteil, der als Mediator der Entwicklung von Endokardkissen zu reifen Herzklappen fungiert, ist Periostin (Butcher et al. 2007).

Hervorzuheben ist die Tatsache, dass unzählige Gene extrazellulärer Matrixkomponenten, die während der Organogenese des Herzens in spezifischer Art und Weise variieren, einen Expressionsverlust nach Abschluss der Organentwicklung zeigen. Während beim gesunden Erwachsenen keine Expression mehr nachweisbar ist, kommt es im Rahmen von mit myokardialen *Remodelling* einhergehenden kardiovaskulären Erkrankungen zu einer deutlichen Reexpression. Insbesondere zur Rolle der im Fokus der vorliegenden Arbeit stehenden zellulären Adhäsionsproteine Fibronektin und Tenascin-C wird in folgenden Kapiteln noch genauer eingegangen.

### **2.2.3. Bedeutung der extrazellulären Matrix im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen**

Das im Rahmen sowohl von primären als auch von sekundären Herzmuskelerkrankungen stattfindende myokardiale Gewebe-*Remodelling* umfasst neben einer inflammatorischen Reaktion und einer Aktivierung ortsständiger Fibroblasten eine grundlegende strukturelle und funktionelle Reorganisation der Matrix. Dieser im Folgenden erläuterte Prozess ist Hauptfokus der vorliegenden Arbeit. Das myokardiale *Remodelling* im Rahmen von Ischämien, Druck- oder Volumenbelastung geht einher mit Hypertrophie, Apoptose und Nekrose der Kardiomyozyten sowie Fibroblastenaktivierung und -proliferation. Im Rahmen dessen kommt es insbesondere zur Entstehung von Myofibroblasten, welche durch Alpha-glattmuskuläre Aktinfilamente (ASMA) charakterisiert sind (Swynghedauw 1999).

Der Myofibroblast sezerniert vermehrt ECM-Moleküle wie Fibronektin, Tenascin-C und verschiedene Kollagene sowie proinflammatorische Zytokine

und bewirkt somit grundlegende Veränderungen der Zusammensetzung der cECM (Brown 2005).

Die ECM kann nur temporär, also reversibel umgeformt sein oder sich langfristig an die veränderte biomechanische Beanspruchung anpassen mit letztendlich nachteiliger Kollagenablagerung, linksventrikulärer Dilatation und Herzinsuffizienz (Graham et al. 2008).

Bei Herzerkrankungen mit Druckbelastung wie der Aortenklappenstenose konnte neben der Myozytenhypertrophie eine Anhäufung von Kollagenen zwischen den Myozyten gefunden werden, welche zu einer Versteifung des linken Ventrikels und im Weiteren einer Einschränkung der diastolischen Funktion führt (Weber und Brilla 1991, Boluyt et al. 2005). In tierexperimentellen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass es bereits 4 Wochen nach Induktion eines arteriellen Hypertonus zum Auftreten von Fibrosierung im Bereich der Adventitia intramyokardialer Koronarien der Ratten kommt, nach 8 Wochen manifestiert sich eine diffuse interstitielle Fibrose. Diese Fibrose ersetzt jedoch nicht im Sinne von Narbengewebe zugrunde gegangene Myozyten. Erst nach ca. 12 Wochen treten fibröse Areale sekundär im Rahmen von Myozytennekrose auf. Nach 32 Wochen betrug der Kollagengehalt das ca. 6-fache verglichen mit gesunden Kontrolltieren (Brilla et al. 1993). Eine größere Bedeutung als die Mengenzunahme hat jedoch die vermehrte Quervernetzung des Kollagens in Hinblick auf eine zunehmende Versteifung des Ventrikels (Norton et al. 1997).

In Herzgewebe von Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie zum Beispiel konnte mittels Genexpressionsanalysen eine Korrelation zwischen erhöhten mRNA Expressionslevel von Connective Tissue Growth Faktor (CTGF), der Expression von ECM-Genen wie Fibronectin, Versican oder bestimmten Kollagenen gefunden werden (Gabrielson et al. 2007).

Auch als Antwort auf akute Ischämien kommt es zu Myozytenhypertrophie und Fibroblastenproliferation, mit der Folge erhöhter Kollagenablagerung und Veränderungen von ECM-Proteinen. Entzündung und Narbenbildung findet im Bereich des infarzierten Gewebes statt mit gleichzeitigem Anstieg von Lamininen und  $\beta$ 1-Integrin an der Grenzfläche von Myokard zu Narbengewebe (Matsushita et al. 1999). Fibroblasten sezernieren Angiotensin II und TGF- $\beta$

wodurch der Kollagenumsatz in Umgebung als auch fernab vom Infarktareal beeinflusst wird (Weber 2004). TGF- $\beta$  kann Myozytenhypertrophie triggern und die Kollagenase-Produktion hemmen sowie die TIMP-Synthese erhöhen, was zur Akkumulation von cECM-Proteinen führt.

So konnten beispielsweise bei der beginnenden linksventrikulären Hypertrophie erhöhte Serumlevel von TIMPs als Zeichen für Matrixakkumulation und Fibrose nachgewiesen werden. Dagegen fielen im fortgeschrittenen Stadium erhöhte Serumlevel von MMPs auf, welche eine ECM-Degradation mit myokardialem Strukturverlust und Abnahme der linksventrikulären Funktion reflektieren (Polyakova et al. 2004). Verglichen mit gesunden Patienten konnten bei Patienten mit Linksventrikelhypertrophie deutlich höhere Serumkonzentrationen von MMP-9 nachgewiesen werden, wobei bei Patienten mit konzentrischer Hypertrophie signifikant höhere Level als bei Patienten mit exzentrischer Hypertrophie gefunden wurden (Franz et al. 2009).

Fibronectin und Tenascin-C haben eine besondere Bedeutung, da sie als Adhäsions-modulierende Proteine eine wichtige Rolle in der Regulation von Zellwachstum, -migration und -proliferation spielen sowohl in der Embryonalentwicklung als auch im Rahmen des *Remodelling* unter pathologischen Bedingungen (Tamaoki et al. 2005) und werden im Folgenden noch näher beschrieben.

## **2.3. Die zellulären Adhäsionsproteine Fibronectin und Tenascin-C**

### **2.3.1. Fibronectin**

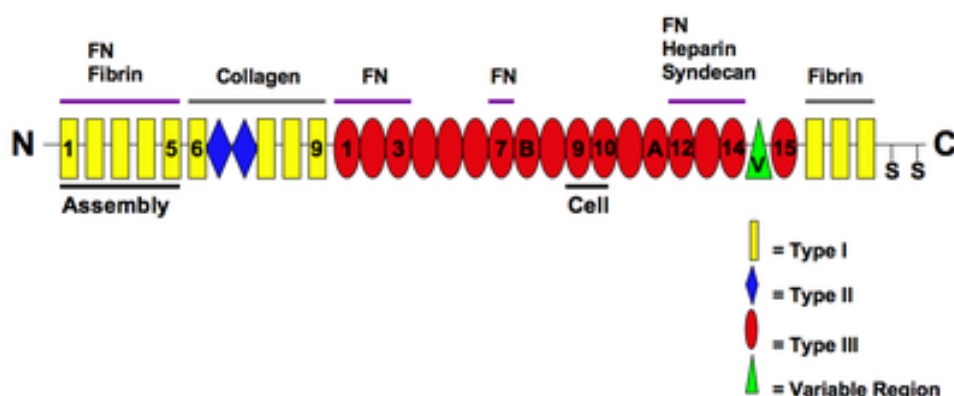
Fibronectin ist ein großes Glykoprotein bestehend aus 2 nahezu identischen Monomeren, welche am C-terminalen Ende über Disulfidbrücken verbunden sind. Es ist aus 3 sich wiederholenden Sequenzen, den sogenannten Typ-I, Typ-II und Typ-III *repeats* aufgebaut, woraus sich mehrere globuläre Domänen, also strukturell unabhängige Einheiten, ergeben. Vermittelt durch diese globulären Domänen ist das Molekül in der Lage, Kollagene, Heparin, Fibrin und Proteoglykane zu binden (Casscells et al. 1990).



Durch alternatives *Splicing* der mRNA entstehen unterschiedliche Isoformen des Fibronektin, mehr als 20 sind bis dato bekannt (Farhadian et al. 1995). Drei Bereiche des Moleküls können alternativem *Splicing* unterliegen: die ED-A<sup>+</sup> (*type III homology extra domain A*), die ED-B<sup>+</sup> (*type III homology extra domain B*) und die IIICS (*type III homology connectin segment*) – Region. Die Molekülstruktur von Fibronektin und seinen Bindungsdomänen ist in Abbildung 2 dargestellt (**Abbildung 2**).

ED-A<sup>+</sup> und ED-B<sup>+</sup> Fibronektin spielen insbesondere bei der Gewebsstrukturierung während der Embryonalentwicklung eine Rolle, kommen in gesunden adulten Geweben jedoch nahezu nicht vor. Im Rahmen von pathologischen Gewebeumbauprozessen, zum Beispiel im Rahmen von Malignomen, werden diese *Splicing*-Varianten jedoch reexprimiert und daher auch als onkofetale Varianten bezeichnet (Schwarzbauer 1991).

Fibronektin erfüllt eine Brückenfunktion zwischen der Oberfläche der Kardiomyozyten und der Basallamina (Ahumada und Saffitz 1984). Außerdem spielt es eine wichtige Rolle in der Wundheilung (Potts und Campbell 1996). Die funktionell bedeutende Interaktion von Fibronektin mit Zellen wird insbesondere über die Bindung an  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin vermittelt, welches vor allem von Endothelzellen exprimiert wird (Hynes 2002). Fibronektin kann von nahezu allen Zelltypen mit Ausnahme von Kardiomyozyten synthetisiert werden (Hein und Schaper 2001).



**Abbildung 2:** Molekülstruktur von Fibronektin und seinen Bindungsdomänen (Quelle: [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/66/The\\_Molecular\\_Structure\\_of\\_Fibronectin\\_and\\_its\\_Binding\\_Domains.png](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/66/The_Molecular_Structure_of_Fibronectin_and_its_Binding_Domains.png))

### **2.3.1.1. Die Bedeutung von Fibronektin für die Herzentwicklung und im Rahmen des myokardialen Gewebe-Remodelling**

Fibronektin zeigt im sich entwickelnden menschlichen Herzen bis zur Geburt eine relativ konstante Expression und Verteilung, allerdings kommt es postnatal zu einem abrupten Expressionsverlust (Kim et al. 1999). Fibronektin ist während der Embryonalentwicklung von essentieller Bedeutung für die dreidimensionale Organisation Herzens (George et al. 1997). Für die Kontrolle von Wachstum und Differenzierung scheint vor allem Plasma-Fibronektin von Bedeutung zu sein. So konnte an Fibronektin-*Knock-Out*-Mäusen gezeigt werden, dass mütterliches Fibronektin im Serum für eine normale Differenzierung des embryonalen Herzens notwendig ist (Samuel et al. 1994). Die *Splicing*-Varianten ED-A<sup>+</sup> und ED-B<sup>+</sup> Fibronektin zeigen eine auffällig gesteigerte Expression und Deposition in Bereichen sich entwickelnder Gefäßstrukturen während der Embryonalentwicklung sowie im Rahmen von Angiogeneseprozessen bei verschiedenen pathologischen Zuständen wie der Tumorentwicklung oder myokardialer Hypertrophie.

In Gefäßstrukturen gesunder Erwachsener zeigt sich dieses Phänomen nicht oder allenfalls in minimaler Ausprägung, so dass von einer funktionellen Bedeutung der Fibronektin-*Splicing*-Varianten für die Gefäßneubildung auszugehen ist, wobei die genauen funktionellen Mechanismen aktuell nur unzureichend verstanden sind (Astrof und Hynes 2009).

Bei Patienten mit Druckbelastung infolge einer Aortenstenose konnte eine Zunahme des Fibronektin Gehaltes im Rahmen der kompensatorischen Hypertrophie mit weiterem Anstieg bei Dekompensation nachgewiesen werden (Hein et al. 2003). Die erhöhte Fibronektinsynthese tritt dabei vor der Kollagenexpression auf (Swynghedauw 1999). Bei Mäusen mit Mangel an ED-A<sup>+</sup> Fibronektin wurden deutlich reduzierte Atheroskleroselevel gefunden, sodass dem Protein auch eine wichtige Rolle im Fortschreiten des atherogenen Prozesses zugeschrieben werden kann (Babaev et al. 2008). Im Tierversuch konnte auch festgestellt werden, dass die Abwesenheit von ED-A<sup>+</sup> Fibronektin nach Myokardinfarkten eine geringere MMP-2- und MMP-9-Aktivität, weniger Gewebeinflammation und Myofibroblasten-Transdifferenzierung nach sich zieht.

Im Vergleich mit Wildtyp-Mäusen hatten daher genetisch veränderte Mäuse, die kein ED-A<sup>+</sup> Fibronectin bilden konnten, eine bessere Linksventrikelfunktion und geringerer Myokardfibrosierung bei gleicher Infarktgröße (Arslan et al. 2011).

An Ratten konnte in Transplantatherzen mit chronischer Abstoßungsreaktion eine Reexpression von ED-A<sup>+</sup> Fibronectin in Kolokalisation mit B<sup>+</sup> Tenascin-C sowie ASMA in Gefäßen mit Transplantatvaskulopathie als auch in Fibrosearealen nachgewiesen werden (Franz et al. 2010, Franz et al. 2011).

In vitro konnte außerdem gezeigt werden, dass Fibronectin eine Myozytenhypertrophie induziert (Chen et al. 2004). Es scheint daher eine Rolle bei der Initiierung des *Remodelling*-Prozesses zu spielen und stellt aber auch seinerseits ein Substrat des *Remodelling* dar.

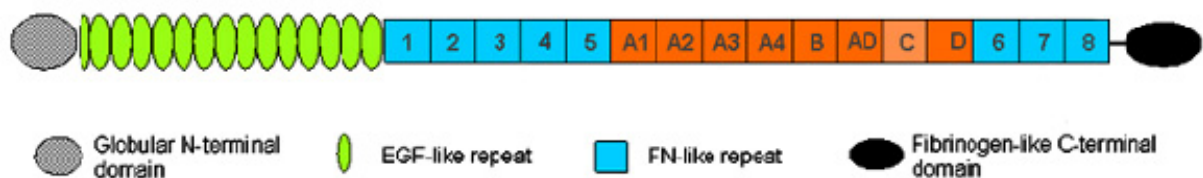
### 2.3.2. Tenascin-C

Fünf Tenascin-Isoformen sind bis dato bekannt, nämlich Tenascin-C, -R, -W, -X und -Y, die sich in Struktur und Länge ihrer Einzelketten unterscheiden, welchen jedoch ein übergeordnetes Strukturschema hinsichtlich der Anordnung von Moleküldomänen gemein ist. Die Synthese der Tenascine erfolgt hauptsächlich durch Zellen des Bindegewebes.

Als erstes beschrieben wurde Tenascin-Cytoactin (Tenascin-C). Tenascin-C ist ein Glykoprotein bestehend aus Monomeren, welche eine hexamerische Struktur bilden, indem sie am N-terminalen Ende über Disulfidbrücken verbunden sind. Aufgrund dieser Molekülstruktur wird das Protein auch als Hexabrachion bezeichnet. In Richtung C-terminalen Ende schließt sich eine variierende Zahl sogenannter *EGF like repeats* und *fibronectin type III like repeats* an. C-terminal finden sich globuläre Domänen mit Strukturhomologie zu Fibrinogen, welche wiederum in ihrer Anzahl variieren (Belanger und Beaulieu 2000, Chiquet-Ehrismann 2004). Die Molekülstruktur einer Tenascin-C-Kette ist in Abbildung 3 dargestellt (**Abbildung 3**).

Auch beim Tenascin werden durch alternatives *Splicing* im Bereich von 9 Fibronectin-Typ-III-*repeats* (A1-D) verschiedene Molekülvarianten generiert (Mighell et al. 1997). Die Expression von Tenascin-C wird von verschiedenen Wachstumsfaktoren sowie verschiedenen Interleukinen, Glukokortikoiden reguliert, kann aber auch durch mechanischen Stress induziert werden (Ekblom

et al. 1993, Mackie et al. 1998). Zu den häufiger vorkommenden Varianten zählen einerseits die große, ungespleißte Isoform (Tenascin-CL = large, 280 kDa) und andererseits die kleine, komplett gespleißte Variante (Tenascin-CS = small, 190 kDa) (Siri et al. 1991). Wenig gespleißtes Tenascin-CL kommt vor allem in der ECM im Umbau befindlicher Gewebsstrukturen vor (Murphy-Ullrich et al. 1991, Tucker et al. 1994), während Tenascin-CS insbesondere in der ECM reifer adulter Gewebe (Sehne oder Knorpel) nachweisbar ist (Chiquet-Ehrismann et al. 1991). Tenascin-CS bindet deutlich stabiler an Fibronectin und erlangt dadurch stärkere Adhäsivität in Anpassung an die Ansprüche an reife Gewebsstrukturen (Chung et al. 1995); Tenascin-CL sorgt durch seine anti-adhäsiven Eigenschaften für die in im Umbau befindlichen Geweben erforderliche Flexibilität (Siri et al. 1995).



**Abbildung 3:** Molekülstruktur einer Tenascin Einzelkette (Quelle: <http://www.sirius-biotech.com/products-services/antibodies/>)

### 2.3.2.1. Bedeutung von Tenascin-C für die Herzentwicklung und im Rahmen des myokardialen Gewebe-Remodelling

Am Herzen spielt Tenascin-C während der Embryonalentwicklung eine wichtige Rolle, ist jedoch beim gesunden Erwachsenen im Myokard nicht nachweisbar. So kommt es während der Differenzierung von präkardialen mesodermalen Zellen zu Kardiomyozyten bzw. endokardialen Zellen zu einem deutlichen Expressionsanstieg von Tenascin-C. Im Gegensatz dazu wird die Expression des Moleküls zum Zeitpunkt des Transfers von Zellen des proepikardialen Organs als Vorläufer der Koronargefäße an die Herzoberfläche herunterreguliert (Imanaka-Yoshida et al. 2003).

Zur Reexpression kommt es im Rahmen von pathologischen Bedingungen. Im Vergleich zu anderen ECM-Proteinen, welche stark adhäsiv auf Zellen wirken und deren *Spreading* fördern, sind diese Eigenschaften bei Tenascinen nur gering ausgeprägt. Tenascin-C weist im Gegensatz zu anderen ECM-Proteinen, eine hemmende Wirkung hinsichtlich des Ausmaßes der Zelladhäsion an Fibronektin auf und wird deshalb zu den Adhäsions-modulierenden Molekülen gezählt (Orend und Chiquet-Ehrismann 2000).

So findet man Tenascin-C im Akutstadium nach Myokardinfarkten an der Grenzfläche von Infarktareal zu intaktem Myokard (Willems et al. 1996). Außerdem ist Tenascin-C in der Lage, die Verbindung zwischen Kardiomyozyten und Bindegewebe zu lockern und fördert somit das *Remodelling* am Rand des verbleibenden Myokards (Imanaka-Yoshida et al. 2001). Außerdem reguliert es die Rekrutierung von Myofibroblasten in infarziertes Gewebe (Tamaoki et al. 2005).

Tenascin-C interagiert mit Zell-Oberflächenrezeptoren und bindet auch an extrazelluläre Matrixproteine wie Fibronektin (Chiquet-Ehrismann et al. 1991). Es inhibiert das Anhaften von Fibroblasten und Endothelzellen an eine Reihe von adhäsiven Proteinen (Chiquet-Ehrismann 1991).

Erhöhte Serumlevel von Tenascin-C wurden bei Patienten mit Herzinsuffizienz im Rahmen einer dilatativen Kardiomyopathie nachgewiesen und sind mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Terasaki 2007).

Tenascin-C wird auch bereits in sehr frühen Stadien einer akuten Myokarditis vermehrt exprimiert (Imanaka-Yoshida et al. 2002). Wenig gespleißte Tenascin-C-Varianten können zur Entstehung der klassischen Atherosklerose beitragen (Silacci et al. 2005, Pedretti et al. 2010, Pawitan 2010).

Eine Assoziation der Tenascin-C-mRNA-Expression zum Grad der chronischen Rejektion konnte in einem heterotopen Herztransplantationsmodell an Ratten demonstriert werden (Franz et al. 2010).

### **2.3.3. Humane rekombinante Antikörper gegen Fibronectin- und Tenascin-C-*Splicing*-Varianten – potentielle Bedeutung für zielgerichtete Therapie struktureller myokardialer Erkrankungen**

Humane rekombinante Antikörper im SIP („small immunoprotein“)-Format, welche gegen unterschiedliche Fibronectin- und Tenascin-C-*Splicing*-Varianten gerichtet sind, konnten in den vergangenen Jahren entwickelt werden, darunter SIP-F8 gegen ED-A<sup>+</sup> Fibronectin; SIP-L19 gegen ED-B<sup>+</sup> Fibronectin; SIP-F16 gegen A1<sup>+</sup> Tenascin-C; SIP-G11 gegen C<sup>+</sup> Tenascin-C und SIP-D11 gegen D<sup>+</sup> Tenascin-C. Interessant an diesen Antikörpern ist vor allem die Tatsache, dass diese als *Carrier*-Moleküle für diagnostische oder therapeutische Substanzen genutzt werden können. So können beispielsweise immunmodulierende Zytokine mit dem Antikörper gekoppelt werden. Auch Medikamente oder zur molekularen Bildgebung genutzte Stoffe wurden bereits mit den Antikörpern fusioniert und in mehreren Studien zum Einsatz gebracht. Vorteil an dieser Antikörper-gekoppelten Applikation ist, dass sich nach einer systemischen Verabreichung die Wirksubstanz gezielt in den Körperbereichen, die eine Expression des Zielantigens zeigen, anreichert. Durch diese zielgerichtete Therapie kann einerseits die Effizienz eines Therapeutikums erhöht und somit die Dosis reduziert werden, andererseits können systemische Nebenwirkungen gemindert werden (Trachsel und Neri 2006, Villa et al. 2008).

Im Tiermodell wurden die Antikörper bereits in therapeutischer Indikation als Transfermoleküle für antiinflammatorische oder antiangiogenetische Substanzen verwendet, mit dem Vorteil, die Therapeutika zielgerichtet an das erkrankte Gewebe heranzubringen, wodurch sich einerseits die Wirkung erhöht, andererseits gesundes Gewebe ausgespart wird (Brack et al. 2006, Schliemann und Neri 2010).

Zum Beispiel wurde Interleukin-10 gekoppelt an den F8-Antikörper zur zielgerichteten Therapie von Arthritis bei Mäusen angewandt (Schwager et al. 2009).

Vor allem im Rahmen von Malignomen findet der Antikörper Verwendung: So konnte gezeigt werden, dass F8 selektiv an neu formierte Blutgefäße im Maus-

Tumormodell bindet, sodass dieser als Transportmolekül für Anti-Tumor-Therapeutika geeignet scheint (Villa et al. 2008).

L19, ein Antikörper gegen ED-B<sup>+</sup> Fibronectin, wurde ebenfalls bereits erfolgreich mit Radionukliden, Zytokinen und anderen therapeutischen Substanzen konjugiert und in-vitro sowie in-vivo getestet (Borsi et al. 2002, Carnemolla et al. 2002, Ebbinghaus et al. 2005).

Unter Nutzung des gegen ED-A<sup>+</sup> Fibronectin gerichteten F8 Antikörpers sowie des gegen A1<sup>+</sup>-Tenascin-C gerichteten F16 Antikörpers konnte in einer Vorgängerarbeit der vorliegenden Studie an humanem Myokardgewebe des rechten Vorhofohrs von Patienten mit KHK und/oder Aortenklappenstenose eine relevante Reexpression dieser *Splicing*-Varianten, welche in gesundem adultem Myokardgewebe nicht vorkommen, im Rahmen dieser Erkrankungen nachgewiesen werden (Franz et al. 2010). Dabei korrelierte der histologische Schädigungsgrad mit dem Ausmaß der Reexpression, wobei ED-A<sup>+</sup> Fibronectin eine klare Gefäßpositivität zeigte, während A1<sup>+</sup>-Tenascin C in Bereichen interstitieller und perivaskulärer Fibrose nachweisbar war. Aufgrund der potentiellen Nutzbarkeit der humanen rekombinanten SIP-Antikörper als Transfermoleküle für Pharmaka im Sinne einer zielgerichteten Therapie stellt sich Frage, ob die im rechten Vorhofohr nachgewiesene Reexpression onkofetaler *Splicing*-Varianten gleichsam im linken Ventrikel bestehenden Veränderungen abbildet. Da das rechte Vorhofohr im Rahmen von herzchirurgischen Eingriffen unter Nutzung einer Herz-Lungen-Maschine regelmäßige zwecks Kanülierung des rechten Vorhofes entfernt wird, könnte anhand einer immunhistochemischen Untersuchung des Vorhofohres festgestellt werden, wie es um den myokardialen Schädigungsgrad und den Expressionsstatus von Tenascin-C- und Fibronectin-Varianten im linken Ventrikel bestellt ist und ob möglicherweise eine Antikörper-vermittelte Applikation von Pharmaka zur Reduktion von Fibrose und Gefäßveränderungen sinnvoll ist.

## 2.4. Zielstellung

Die bisher verfügbaren Erkenntnisse zum ECM-*Remodelling* basieren auf Untersuchungen von Myokardgewebe rechter Vorhofohren von Patienten mit Aortenklappenstenose und/oder Koronarer Herzerkrankung. Es stellt sich nun die Frage, welche Relevanz diese Befunde hinsichtlich ihrer Aussagekraft für das Gesamtorgan und insbesondere den funktionell relevanten linken Ventrikel haben. So gibt es bisher nahezu keine Daten zur Expression von ED-A<sup>+</sup> Fn und A1<sup>+</sup> Tn-C im linken Ventrikel. Darüber hinaus gilt es zu überprüfen, ob die humanen rekombinanten Antikörper gegen ED-A<sup>+</sup> Fn (F8) und A1<sup>+</sup> Tn-C (F16) Reaktivität auch im linken Ventrikel zeigen. Dies wäre eine zwingende Voraussetzung für ihren diagnostischen oder therapeutischen Einsatz bei Herzerkrankungen.

Der Fokus der vorliegenden Arbeit lag somit auf der intra-individuell vergleichenden Analyse des ECM-Umbaus in Proben rechter Vorhofohren und des linksventrikulären Septums bei Patienten mit Aortenklappenstenose allein oder in Kombination mit einer Koronaren Herzerkrankung.

Zu diesem Zwecke sollen folgende Teilaspekte bearbeitet werden:

- Vergleichende Analyse der histologischen Veränderungen in Proben des rechten Vorhofohres und des linksventrikulären Septums von Patientin mit AS oder AS in Kombination mit einer KHK unter besonderer Berücksichtigung der Parameter interstitielle Fibrose und kardiomyozytäre Schädigung unter Einbeziehung von Korrelationsanalysen.
- *Real-time* PCR-basierte Genexpressionsanalysen von 84 strukturell und funktionell relevanten ECM- und Adhäsionsmoleküle an repräsentativen Proben mit unterschiedlichen histologischen Schädigungsgraden im intra-individuellen Vergleich zwischen rechtem Vorhofohr und linkem Ventrikel.



- Vergleichende Untersuchungen zur Reexpression von ED-A<sup>+</sup> Fn und A1<sup>+</sup> Tn-C sowohl auf m-RNA-Ebene als auch auf Proteinebene.
- Qualitative Analyse der Gewebsverteilungsmuster von ED-A<sup>+</sup> Fn und A1<sup>+</sup> Tn-C in Gewebeproben rechter Vorhofohren und der korrespondierenden linksventrikulären Septen mittels Immunofluoreszenzmarkierungen unter Verwendung der humanen SIP-Format-Antikörper F8 und F16.
- Semiquantitative Bewertung des Ausmaßes der Proteindeposition von ED-A<sup>+</sup> Fn und A1<sup>+</sup> Tn-C im Gewebe rechter Vorhofohren und korrespondierender linksventrikulärer Septen unter Einbeziehung von Korrelationsanalysen.

### **3 Originalarbeit**

**Comparative analysis of oncofetal fibronectin and tenascin-C expression in right atrial auricular and left ventricular human cardiac tissue from patients with coronary artery disease and aortic valve stenosis. Baldinger A, Brehm BR, Richter P, Bossert T, Gruen K, Hekmat K, Kosmehl H, Neri D, Figulla HR, Berndt A, Franz M. Histochem Cell Biol 135: 427-41, 2011**

## 4 Diskussion

In der hier vorgelegten Dissertationsschrift wird erstmals eine intra-individuell vergleichende Analyse zwischen humanem Myokardgewebe rechter Vorhöfohren und des linksventrikulären Septums von Patienten mit Aortenklappenstenose oder Aortenklappenstenose in Kombination mit koronarer Herzerkrankung im Hinblick auf histologische Veränderungen, das *Remodelling* der kardialen ECM und die Reexpression von ED-A<sup>+</sup> Fibronectin und A1<sup>+</sup> Tenascin-C beschrieben. Dabei gingen jeweils 2 Proben (rechtes Vorhofohr und linksventrikuläres Septum) pro Patient in die Analysen ein. Untersucht wurden 17 Patienten mit Aortenklappenstenose und 13 Patienten mit Aortenklappenstenose und koronarer Herzerkrankung.

### 4.1. Histologische Veränderungen

Die Analyse des Grades der histologischen Veränderungen erfolgte auf der Basis eines definierten Scoring-Systems, welches zum einen die Einschätzung des Ausmaßes der interstitiellen Fibrose und zum anderen den Schädigungsgrad der Kardiomyozyten einbezieht (**Tabelle 1**).

Für beide Krankheitsgruppen konnten sowohl in den Proben rechter Vorhöhren als auch des linksventrikulären Septums verschiedene Grade der histologischen Schädigung nachgewiesen werden. Grundsätzlich lässt sich feststellen, dass Proben von Patienten mit Aortenklappenstenose und koronarer Herzerkrankung höhere Schädigungsgrade aufwiesen im Vergleich zur Gruppe der Patienten mit alleiniger Aortenklappenstenose. Somit ist davon auszugehen, dass die Koexistenz von Aortenklappenstenose mit konsekutiver Druckbelastung und koronarer Herzerkrankung mit konsekutiver chronischer myokardialer Ischämie das Ausmaß der pathologischen Umbauvorgänge im Myokardgewebe steigert. Die intra-individuell vergleichende Analyse der histologischen Veränderungen in rechten Vorhöfohren und linksventrikulären Septen der Patienten ergab interessanterweise eine signifikante positive Korrelation. Diese Beobachtungen geben Anlass zu der Hypothese, dass das myokardiale Gewebe-*Remodelling* keine rein lokale Reaktion auf veränderte

Perfusionverhältnisse oder Druckbelastung zu sein scheint. Vielmehr lässt sich dahinter ein das gesamte Myokard einbeziehender *Remodelling*-Prozess vermuten, welcher möglicherweise durch humorale Faktoren vermittelt wird. Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen sind von großem sowohl pathobiologischem als auch potentiell klinisch-therapeutischem Interesse und sollten Gegenstand weiterführender Analysen sein.

Grad	Interstitielle Fibrose	Kardiomyozytenschaden		Summe (Grad Fibrose + Kardiomyozytenschaden)	Histologische Schädigung (RAA/LVS)
0	keine	normale Zellmorphologie		0	keine
1	geringe	physiologische Hypertrophie ohne Zeichen eines Kardiomyozytenschadens		0.5-2	geringe
2	mäßige	pathologische Hypertrophie mit Zeichen eines Kardiomyozytenschadens		2.5-4	mäßige
3	starke	Kardiomyozytendegeneration		4.5-6	starke

**Tabelle 1:** Scoring-System zur Bewertung der histologischen Schädigung der untersuchten Gewebeproben (Baldinger et al. 2011, modifiziert)

## 4.2. ECM - Genexpressionsanalyse

In einer von unserer Arbeitsgruppe kürzlich durchgeführten Analyse des kardialen ECM-*Remodelling* anhand von Gewebeproben rechter Vorhoföhren von Patienten mit Aortenklappenstenose und/oder koronarer Herzerkrankung

konnte nachgewiesen werden, dass das Ausmaß des komplexen ECM-Umbaus eine korrelative Assoziation zum Grad der histologischen Gewebeschädigung aufweist. In der Regel waren hierbei höhere Schädigungsgrade mit erhöhten Expressionslevels der Mehrheit der untersuchten ECM-Moleküle assoziiert (Franz et al. 2010).

Basierend darauf erfolgte in der vorliegenden Arbeit eine Analyse der Genexpressionslevel von 84 strukturell und funktionell relevanten extrazellulären Matrix- und Adhäsionsmolekülen mittels quantitativer *real time* PCR exemplarisch an Vorhof- und Septumproben von 4 Patienten, die sowohl in Vorhof als auch Ventrikel übereinstimmend jeweils keine, geringe, mäßige oder starke histologische Veränderungen aufwiesen. Auf Grund der fehlenden Verfügbarkeit von Myokardgewebe gesunder Probanden wurden die Resultate auf die Mittelwerte der jeweiligen Expressionslevel der 84 Gene aus 5 Proben rechter Vorhöfohren ohne jegliche histologische Auffälligkeiten normiert. Hierbei zeigte sich, dass die Genexpressionslevel der Mehrheit der Matrix- und Adhäsionsmoleküle in den Septumproben jeweils höhere Werte aufwiesen als in den jeweiligen Vorhofproben. 23 Gene zeigten interessanterweise eine gleichsinnige, über 2,5-fache Expressionssteigerung in Vorhof- und Septumbiopsie.

Exemplarisch sei hier der *connective tissue growth factor* (CTGF) erwähnt. CTGF ist ein Wachstumsfaktor der nach Myokardischämien im Tiermodell zu einer fortschreitenden Fibrosierung beiträgt (Dean et al. 2005). Auch als Antwort auf Druckbelastung wird CTGF induziert, wobei im Tiermodell eine Reduktion der CTGF-Level und somit auch der Fibrosierung durch Verabreichung von Sartanen erreicht werden konnte (Iwamoto et al. 2010). Die CTGF-Konzentration im Plasma wurde darüber hinaus als potentieller Biomarker für kardiale Dysfunktion bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz vorgeschlagen (Koitabashi et al. 2008).

Des Weiteren fand sich eine gesteigerte Expression bestimmter Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) wie MMP1, MMP7, MMP8, MMP9, MMP12 und MMP14, sowie von *tissue inhibitor of metalloproteinase 3* (TIMP3). Es ist bekannt, dass bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz verglichen mit gesunden Kontrollen ein Ungleichgewicht von MMPs und TIMPs im Plasma

vorliegt (Yang et al. 2010). Durch gezielte Hemmung spezifischer MMPs konnte experimentell auch das linksventrikuläre *Remodelling* nach Myokardinfarkten verringert werden (Lindsey 2004).

Auch Versican, von dem bekannt ist, dass es mit der mRNA-Expression von CTGF korreliert und somit ebenfalls in den extrazellulären Matrixumbau im Rahmen von Ischämien involviert ist, zeigte in unseren Untersuchungen eine relevant erhöhte Expression (Gabrielsen et al. 2007).

Das strukturell und funktionell bedeutende Zelladhäsionsmolekül Tenascin-C zeigte ebenfalls eine deutliche Expressionssteigerung in erkranktem, d.h. histologisch geschädigtem Gewebe im Vergleich zu nicht geschädigtem Myokardgewebe. In einem Rattenmodell der Rechtsherzinsuffizienz konnten Hessel und Mitarbeiter ebenfalls eine gesteigerte Tenascin-C-Genexpression sowie erhöhte Tenascin-C-Plasmalevel im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisen (Hessel et al. 2009). Umgekehrt konnte ein Abfall der Tenascin-C- sowie MMP-9-Serumlevel bei Patienten mit Herzinsuffizienz nach erfolgter kardialer Resynchronisationstherapie im Sinne eines reversen myokardialen Gewebe-*Remodelling* demonstriert werden (Hessel et al. 2007).

Für nur ein Gen fand sich eine relevant (über 2,5-fach) verminderte Expression: Kollagen Typ I Alpha 1 (COL1A1). Es handelt sich um ein pro-fibrotisches Gen, für welches eine negative Korrelation mit der linksventrikulären Funktion nachgewiesen werden konnte (Felkin et al. 2009). Eine erklärende Hypothese zu diesem Phänomen kann auf der Basis des aktuellen Erkenntnisstandes nicht formuliert werden.

Resümierend ist festzustellen, dass es bei Patienten mit Aortenklappenstenose allein oder in Kombination mit koronarer Herzerkrankung zu einem auffälligen Umbau der ECM nicht nur im Bereich des linksventrikulären Septums sondern auch im räumlich entfernten und nicht direkt durch Krankheits-assoziierten Stimuli (Druckbelastung und chronische myokardiale Ischämie) alterierten rechten Vorhofohr kommt. Dies spricht dafür, dass es im Rahmen der Gewebsumbauprozesse bei den von uns untersuchten Herzerkrankungen zu einem generalisierten, das gesamte Organ einbeziehenden ECM-*Remodelling* kommt, welchen sich qualitativ und quantitativ in Abhängigkeit von der Stärke des pathophysiologischen Stimulus unterscheidet.

### **4.3. mRNA-Expression und Proteindeposition von ED-A<sup>+</sup> Fibronektin und A1<sup>+</sup> Tenascin-C**

ED-A<sup>+</sup> Fibronektin und A1<sup>+</sup> Tenascin-C sind, wie bereits eingangs erwähnt, in gesunden adulten Geweben nicht nachweisbar, zeigen aber bei pathologischen Gewebsumbauprozessen im Rahmen verschiedener Herzerkrankungen eine eindrucksvolle Reexpression (Swynghedauw 1999, Bowers 2010, Brown 2005). Die Mehrheit der Studien zur Expression dieser Moleküle im Rahmen von kardiovaskulären Erkrankungen ist auf Untersuchungen der Serumlevel von Tenascin-C und Fibronektin begründet, nicht zuletzt aufgrund der Tatsache, dass humanes Myokardgewebe insbesondere des linken Ventrikels nur eingeschränkt verfügbar ist. Untersuchungen zu Expression und Gewebeverteilung der funktionell bedeutenden *Splicing*-Varianten ED-A<sup>+</sup> Fibronektin und A1<sup>+</sup> Tenascin-C bei Pathologien des Herz-Kreislauf-Systems existieren daher bislang kaum. Neben ihrer funktionellen Bedeutung für kardiale *Remodelling*-Prozesse wird die wissenschaftlich Attraktivität speziell dieser beiden Molekülvarianten insbesondere dadurch bestimmt, dass humane rekombinante SIP-Format-Antikörper (SIP-F8 gegen ED-A<sup>+</sup> Fibronektin und SIP-F16 gegen A1<sup>+</sup> Tenascin-C) mit potentieller Nutzbarkeit als Vehikel für diagnostische und therapeutische Substanzen existieren. Die Reaktivität dieser Antikörper sowie eine interessante Gewebeverteilung von ED-A<sup>+</sup> Fibronektin und A1<sup>+</sup> Tenascin-C in humanem Myokardgewebe rechter Vorhofohren konnte von unserer Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden. Artgleiche Antikörper gegen eine Reihe anderer *Splicing*-Varianten von Fibronektin und Tenascin-C zeigten hingegen keine Reaktivität (Franz et al. 2010).

In der vorliegenden Studie wurden mittels quantitativer *real-time* rt-PCR die mRNA-Expressionslevel von ED-A<sup>+</sup> Fibronektin und A1<sup>+</sup>-Tenascin-C an 8 Fällen von Patienten mit Aortenklappenstenose und 5 Fällen mit Aortenklappenstenose und koronarer Herzkrankheit untersucht. In der Gruppe mit sowohl Aortenklappenstenose als auch koronarer Herzkrankheit zeigte sich für beide Molekülvarianten eine deutliche Expressionssteigerung gegenüber der Gruppe mit alleiniger Aortenklappenstenose. Diese Beobachtung spricht für die Hypothese, dass die Kombination aus Druckbelastung und Ischämie zu einer

Intensivierung der Gewebsumbauprozesse am Herzmuskel zu führen scheint. Insgesamt fanden sich für A1<sup>+</sup>-Tenascin-C deutlich geringere mRNA-Expressionslevel verglichen mit ED-A<sup>+</sup> Fibronectin. Interessanterweise konnten im rechten Vorhofohr für beide Proteine deutlich höhere Expressionslevel im Vergleich zur Septumprobe detektiert werden. Dieser Befund spricht ein weiteres Mal für die Hypothese, dass das ECM-*Remodelling* kein Vorgang ist, der allein durch lokale Druck- oder Perfusionsänderung induziert wird, sondern vielmehr ein das gesamte Organ einbeziehender, möglicherweise humoral vermittelter Prozess zu sein scheint. In diesem Zusammenhang sei eine tierexperimentelle Studie zu Rejektion nach heterotoper Herztransplantation der Ratte erwähnt. Hier konnten durch detaillierte Untersuchung der ECM-Genexpressionslevel gezeigt werden, dass es im Rahmen der chronischen Abstoßungsreaktion nicht nur im Transplantatorgan sondern auch im „eigenen Herzen“ des Empfängertieres zu einer signifikanten Expressionssteigerung für eine Vielzahl von ECM-Molekülen einschließlich Tenascin-C kommt (Franz et al. 2011).

Hinsichtlich der Gewebeverteilung von ED-A<sup>+</sup> Fibronectin und A1<sup>+</sup> Tenascin-C konnten in der vorliegenden Arbeit durch Immunfluoreszenz-doppelmarkierungen in Kombination mit CD31 als Endothelzellmarker (und damit Marker für vaskuläre Strukturen) klar unterscheidbare Muster beobachtet werden. ED-A<sup>+</sup> Fibronectin ließ sich in Gefäßstrukturen insbesondere luminal in Kolokalisation zur CD31 sowie in Arealen der interstitiellen Fibrose nachweisen. A1<sup>+</sup> Tenascin-C fand sich hingegen exklusiv in Arealen der perivaskulären und interstitiellen Fibrose. Diese Befunde bestätigen frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zur Stratifizierung der Gefäßwand in erkranktem Myokardgewebe rechter Vorhofohren von Patienten mit Aortenklappenstenose und/oder koronarer Herzerkrankung. Diese konnten durch Immunfluoreszenzdreifachmarkierungen unter Einbeziehung der Laminin- $\alpha$ 4-Kette als Marker der endothelialen Basalmembran eine luminale Deposition von ED-A<sup>+</sup> Fibronectin und eine klar extraluminale Deposition von A1<sup>+</sup> Tenascin-C demonstrieren (Franz et al. 2010).

Das Ausmaß der Proteinexpression von ED-A<sup>+</sup> Fibronectin variierte innerhalb der 30 untersuchten Fälle beträchtlich, von fehlender bis hin zu ausgeprägter



Deposition, wobei im intraindividuellen Vergleich die überwiegende Mehrheit der Patienten sowohl qualitativ als auch quantitativ korrespondierende Depositionsmuster zwischen rechtem Vorhofohr und der zugehörigen linksventrikulären Septumbiopsie aufwiesen.

Für A1<sup>+</sup> Tenascin-C war verglichen mit ED-A<sup>+</sup> Fibronectin ein deutlich geringeres Ausmaß der Gesamtproteindeposition festzustellen. Der intra-individuelle Vergleich der Gewebeverteilung ergab jedoch wiederum korrespondierende Befunde zwischen rechten Vorhofohren und zugehörigen linksventrikulären Proben für die Mehrheit der untersuchten Patienten.

In Anbetracht der höheren Expressionslevel von ED-A<sup>+</sup> Fibronectin im Vergleich zu A1<sup>+</sup>-Tenascin C wurde für ED-A<sup>+</sup> Fibronectin eine weiterführende semiquantitativen Analyse der Gewebeproteindeposition durchgeführt. Hierbei zeigte sich eine signifikante positive Korrelation der Proteindeposition in rechten Vorhofohren und den korrespondierendem linksventrikulären Septumbiopsien. Der Vergleich der Krankheitsgruppen (Aortenklappenstenose allein oder in Kombination mit koronarer Herzerkrankung) ergab keinen relevanten Unterschied hinsichtlich der Proteindeposition. Auch zum Grad der histologischen Gewebeschädigung zeigten sich keine korrelativen Beziehungen.

Die Tatsache, dass in der überwiegenden Zahl der Fälle korrespondierende Veränderungen im rechten Vorhofohr und im linken Ventrikel sowohl auf histologischer Ebene als auch hinsichtlich wichtiger Phänomene des ECM-Umbaus gefunden werden konnten, macht das rechte Vorhofohr zu einem potentiell wertvollen diagnostischen Instrument. Diese könnten somit als Reflektor des Gewebe- und ECM-*Remodelling* im gesamten Herzen vorgeschlagen werden. Da im Rahmen von Herzoperationen unter Verwendung einer extrakorporalen Zirkulation (Herz-Lungen-Maschine (HLM)) das rechte Vorhofohr komplikationsfrei und teils sogar routinemäßig reseziert und dann verworfen wird, könnte eine künftige Asservierung mit nachfolgender Analyse des histologischen Schädigungsgrades und wichtiger Marker des ECM-Umbaus einschließlich ED-A<sup>+</sup> Fibronectin und A1<sup>+</sup> Tenascin-C Aufschluss über die Verhältnisse im linken Ventrikel geben. Gleichzeitig könnte anhand der Expressionsmuster von ED-A<sup>+</sup> Fibronectin und A1<sup>+</sup> Tenascin-C evaluiert

werden, ob ein Patient potentiell von einer individualisierten antikörperbasierten zielgerichteten Therapiestrategie zur günstigen Beeinflussung des Krankheitsassoziierten Gewebeumbaus profitieren könnte bzw. für eine solche in Frage käme. Durch die qualitativ und quantitativ relevante Deposition von ED-A<sup>+</sup> Fibronektin im Bereich von Gefäßstrukturen (luminal der Basalmembran) wird das Molekül zu einer über die Zirkulation gut erreichbaren *Target*-Struktur für den SIP-F8-Antikörper, welcher auf Grund seiner strukturellen und funktionellen Besonderheiten als Vehikel für Pharmaka oder diagnostische Substanzen geeignet ist. Hierdurch könnten sich völlig neue Perspektiven im Sinne einer Antikörper-vermittelten zielgerichteten Therapie endovaskulärer Läsionen bei verschiedenen Erkrankungen des kardiovaskulären Systems ergeben. So ist z.B. die Generierung von Fusionsproteinen aus SIP-F8 und Zytokinen wie Interleukin-10 über die Phagen-Display-Technologie möglich (Rybak et al. 2007) und stellt eine potentiell interessante und innovative Therapiestrategie dar. In einem murinen Tumormodell konnte gezeigt werden, dass der F8-Antikörper mit vergleichbarer Affinität sowohl an das humane als auch an das Maus-Antigen bindet und in neugebildeten Blutgefäßen von Tumoren eindrucksvoll akkumuliert (Villa et al. 2008).

In einer Untersuchung zum *Remodelling* der kardialen ECM im Rahmen der chronischen Rejektion nach Rattenherztransplantation konnte für ED-A<sup>+</sup> Fibronektin eine quantitative Assoziation zum Rejektionsgrad nachgewiesen werden. Hinsichtlich der Gewebeverteilung fanden sich vergleichbare Muster, wie sie auch in der vorliegenden Arbeit aufgezeigt werden konnten: eine deutlich Deposition im Bereich von Gefäßstrukturen insbesondere bei Auftreten von Intimaproliferaten im Zuge der Transplantatvaskulopathie und in Bereichen der kardialen interstitiellen Fibrose (Franz et al. 2010, Franz et al. 2011).

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Phänomene des ECM-*Remodelling* können somit offensichtlich als ein generelles Phänomen im Rahmen pathologischer Gewebsumbauprozesse von Herzmuskel- und Gefäßstrukturen betrachtet werden. Dabei scheinen neben der hier nicht untersuchten Schädigung von Kardiomyozyten selbst insbesondere das vaskuläre *Remodelling* und die interstitielle Fibrosierung von Bedeutung zu sein. Die biologische Bedeutung insbesondere der Reexpression von fetalen

Fibronectin- und Tenascin-C-Varianten im Rahmen des ECM-Umbaus bei verschiedenen Herzerkrankungen ist aktuell nur unzureichend verstanden. Aus tierexperimentellen Studien insbesondere zur chronischen Rejektion nach heterotoper Herztransplantation sowie verschiedenen in-vitro Untersuchungen lassen sich diesbezüglich jedoch interessante Hypothesen generieren:

Die Transplantatvaskulopathie als Sonderform der Atherosklerose kann somit als Modellphänomen für erworbene / degenerative Intimaerkrankungen verstanden werden. Histologisch findet sich dabei eine in der Regel konzentrische Intimaverdickung, in welcher proliferative glatte Gefäßmuskelzellen (VSCMs) sowie bestimmte ECM-Komponenten in nachgewiesen werden können (Mitchell 2009).

Die interstitielle Fibrose als zweites Merkmal einer chronischen Abstoßungsreaktion geht mit einer erhöhten Steifigkeit des linken Ventrikels einher und führt so zu einer diastolischen Dysfunktion (Armstrong et al. 1998). Somit ist auch dieses Phänomen nicht spezifisch für den Rejektionsprozess sondern ein allgemeingültiges Phänomen des pathologischen myokardialen *Remodelling* bei verschiedenen Erkrankungen. Der in Fibrosearealen vorherrschende Zelltyp ist der aktivierte Myofibroblast (MyoFb), welcher extrazelluläre Matrixbestandteile produziert (Serini und Gabbiani 1999, Leask 2010).

Ebenso wie die aktivierten VSMCs in Bereichen der Transplantatvaskulopathie sind auch MyoFb durch alpha-glattmuskuläres Aktin (ASMA) als Markermolekül gekennzeichnet (Dilley et al. 1987, Leask 2010). Die ASMA-Reexpression als Zeichen eines pathologischen Gewebeumbaus wurde unter anderem auch nach humaner Herztransplantation beschrieben (Subramanian et al. 2002). Sowohl für den MyoFb als auch für aktivierte VSCMs wurde in Abhängigkeit vom Phänotyp eine Expressionssteigerung von ED-A<sup>+</sup> Fibronectin nachgewiesen (Glukhovs et al. 1989, Kosmehl et al. 1996). ED-A<sup>+</sup> Fibronectin seinerseits ist in vitro jedoch auch ein essentieller Faktor zur Induktion einer Konversion vom Fibroblasten zum Myofibroblasten (Serini et al. 1998) und spielt damit über den Mechanismus der Myofibroblastenkonversion offensichtlich eine wesentliche funktionelle Rolle für die Entstehung der interstitiellen Fibrose.

Auch für Tenascin-C konnte -ohne die verschiedenen *Splicing*-Varianten zu differenzieren- in einer Reihe von Untersuchungen eine wichtige funktionelle Rolle für das myokardiale und vaskuläre *Remodelling* insbesondere als Regulator der Fibroseprogression oder Reflektor der Entzündungsaktivität bewiesen werden (Imanaka-Yoshida et al. 2004, Morimoto et al. 2005). Auch im Rahmen von Atheroskleroseprozessen kommt es zu einer eindrucksvollen Reexpression insbesondere des auch in der vorliegenden Arbeit untersuchten A1<sup>+</sup> Tenascin-C (Pedretti et al. 2010).

Sowohl für ED-A<sup>+</sup> Fibronectin als auch für Tenascin-C-Varianten konnten im Rahmen des myokardialen Gewebe-*Remodelling* deutliche räumliche Assoziationen zueinander und insbesondere zu ASMA sowohl in Gefäßstrukturen als auch in Fibrosearealen demonstriert werden (Franz et al. 2011). Somit kann eine funktionelle Bedeutung dieser Protein-Protein-Interaktionen für Induktion und Progression der beschriebenen Gewebsumbauprozesse postuliert werden.

Abschließend soll noch einmal auf die Bedeutung der Reexpression von ED-A<sup>+</sup> Fibronectin und A1<sup>+</sup> Tenascin-C vor dem Hintergrund des potenziellen diagnostischen und therapeutischen Einsatzes der humanen rekombinanten SIP-Format-Antikörper F8 und F16 bei kardiovaskulärer Erkrankungen eingegangen werden. Immunhistochemische Untersuchungen zur Reexpression von Fibronectin- und Tenascin-C-Varianten im Rahmen von Atheroskleroseprozessen unter Verwendung verschiedener rekombinanter SIP-Antikörper ergaben interessante Befunde:

In einer immunhistochemischen Analyse der Expression von ED-A<sup>+</sup> Fibronectin (SIP-F8-Antikörper), ED-B<sup>+</sup> Fibronectin (SIP-L19-Antikörper) und A1<sup>+</sup> Tenascin-C (SIP-F16-Antikörper) in humanen atherosklerotischen Plaques der Arteria carotis konnte im Vergleich zu Kontrollpräparaten eine selektive intensive Plaqueanfärbung unter Einsatz des SIP-F16-Antikörpers gegen A1<sup>+</sup> Tenascin-C demonstriert werden (Pedretti et al. 2010). Fiechter und Mitarbeiter testeten in vivo an Apolipoprotein-E-defizienten Mäusen acht humane monoklonale Antikörper, welche Radiojod-markiert waren. Es zeigte sich dabei, dass der gegen ED-A<sup>+</sup> Fibronectin gerichtete SIP-F8-Antikörper nach intravenöser Injektion am selektivsten atherosklerotische Plaques markierte

(Fiechter et al. 2011). Diese grundlagenwissenschaftlichen Studien ebnen den Weg zu möglichen zukünftigen in-vivo Untersuchungen atherosklerotischer Plaques, welche durch eine mögliche Differenzierung stabile versus vulnerable Plaques von hohem diagnostischem Interesse sein könnten. Im Weiteren wäre auch eine Anwendung dieser Antikörper zur selektiven Pharmakotherapie denkbar, um damit potentiell die das Fortschreiten des Atheroskleroseprozesses einzudämmen, die Plaquegröße zu stabilisieren bzw. zu reduzieren und somit thrombembolischen Ereignissen vorzubeugen.

Die Bedeutung des Einsatzes der rekombinanten Antikörper SIP-F8 und SIP-F16 für das molekulare *Targeting* von im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen auftretenden Fibrosierungsprozessen sollte auf Grund ihrer hohen klinisch-therapeutischen Relevanz Gegenstand weiterführender Untersuchungen sein.

## 4.4. Schlussfolgerungen

Im Fokus der hier vorliegenden Arbeit stand die vergleichende Analyse der ECM-Reorganisation in Proben rechter Vorhöfohren und des linksventrikulären Septums von Patienten mit Aortenklappenstenose und Aortenklappenstenose in Kombination mit einer koronaren Herzerkrankung in Bezug auf histologische Veränderungen, Änderungen im ECM-Genexpressionsprofil und insbesondere der Reexpression von ED-A<sup>+</sup> Fibronektin und A1<sup>+</sup> Tenascin-C sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene. Einen wesentlichen Aspekt stellte die Evaluierung humaner rekombinanter SIP-Format-Antikörper gegen diese Molekülvarianten mit potenzieller Nutzbarkeit als Vehikel für diagnostische oder therapeutische Substanzen dar. Aus den Ergebnissen dieser Arbeit lassen sich folgende Schlussfolgerungen ziehen:

- Der Grad der histologisch fassbaren Gewebeschädigung im rechten Vorhofohr könnte die Gewebsumbauprozesse im Gesamtorgan, insbesondere im linken Ventrikel reflektieren.
- Für 24 funktionell bedeutende ECM- und Adhäsionsmoleküle zeigt sich eine gleichsinnige relevante Steigerung der mRNA-Expression sowohl im rechten Vorhofohr als auch im linken Ventrikel.
- Sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene zeigen sich qualitativ und quantitativ weitgehend analoge Expressionsmuster von ED-A<sup>+</sup> Fibronektin und A1<sup>+</sup> Tenascin-C im rechten Vorhofohr und im linken Ventrikel.
- Somit ist das im Rahmen verschiedener Herzerkrankungen wie Aortenklappenstenose oder koronare Herzerkrankung stattfindende myokardiale Gewebe-*Remodelling* offensichtlich ein das gesamte Organ einbeziehender Prozess. So betreffen die untersuchten Veränderungen nicht nur Regionen, welche unmittelbar einer Druckbelastung oder chronischen Ischämie ausgesetzt sind sondern können auch in räumlich und funktionell getrennten Arealen des Herzens nachgewiesen werden.

- Das im Rahmen von kardiochirurgischen Eingriffen leicht asservierbare rechte Vorhofohr qualifiziert sich somit als repräsentatives diagnostisches Instrument zur Abschätzung des histologischen Schädigungsgrades und des ECM-Reorganisationslevels im Gesamtorgan sowie als Reflektor des Expressionsstatus von ED-A<sup>+</sup> Fibronektin und A1<sup>+</sup> Tenascin-C im linken Ventrikel. Hieraus könnten sich perspektivisch neue Optionen im Sinne einer individualisierten Diagnostik und Therapieplanung ergeben.
- Die humanen rekombinanten SIP-Format-Antikörper F8 (ED-A<sup>+</sup> Fibronektin) und F16 (A1<sup>+</sup> Tenascin-C) sind neuartige viel versprechende Tools für einen Antikörper-vermittelten zielgerichteten Transfer diagnostischer oder therapeutischer Substanzen direkt zum Ort der Erkrankung sofern die damit verbundenen Gewebsumbauprozesse die Phänomene vaskuläres *Remodelling* und interstitielle Fibrose aufweisen.

## Literaturverzeichnis

- Ahumada GG, Saffitz JE. 1984. Fibronectin in rat heart: a link between cardiac myocytes and collagen. *J Histochem Cytochem*, 32(4):383-8.
- American Heart Association. 2005. 2005 Heart and stroke statistical update. American Heart Association, Dallas, Texas. <http://www.americanheart.org/statistics/othercvd.htm1>
- Armstrong AT, Binkley PF, Baker PB, Myerowitz PD, Leier CV. 1998. Quantitative investigation of cardiomyocyte hypertrophy and myocardial fibrosis over 6 years after cardiac transplantation. *J Am Coll Cardiol*, 32(3):704-710.
- Arslan F, Smeets MB, Riem Vis PW, Karper JC, Quax PH, Bongartz LG, Peters JH, Hoefer IE, Doevendans PA, Pasterkamp G, de Kleijn DP. 2011. Lack of fibronectin-EDA promotes survival and prevents adverse remodeling and heart function deterioration after myocardial infarction. *Circ Res*, 108(5):582-92.
- Babaev VR, Porro F, Linton MF, Fazio S, Baralle FE, Muro AF. 2008. Absence of regulated splicing of fibronectin EDA exon reduces atherosclerosis in mice. *Atherosclerosis*, 197(2):534-40.
- Banerjee I, Fuseler JW, Price RL, Borg TK, Baudino TA. 2007. Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 293(3):H1883-91.
- Bélanger I, Beaulieu JF. 2000. Tenascin in the developing and adult human intestine. *Histol Histopathol*, 15(2):577-85.
- Beltrami CA, Finato N, Rocco M, Feruglio GA, Puricelli C, Cigola E, Quaini F, Sonnenblick EH, Olivetti G, Anversa P. 1994. Structural basis of end-stage failure in ischemic cardiomyopathy in humans. *Circulation*, 89(1):151-63.
- Boluyt MO, Robinson KG, Meredith AL, Sen S, Lakatta EG, Crow MT, Brooks WW, Conrad CH, Bing OH. 2005. Heart failure after long-term supraaortic constriction in rats. *Am J Hypertens*, 18(2 Pt 1):202-12.
- Bonow RO, Carabello BA, Chatterjee K, de Leon AC Jr, Faxon DP, Freed MD, Gaasch WH, Lytle BW, Nishimura RA, O'Gara PT, O'Rourke RA, Otto CM, Shah PM, Shanewise JS; 2006 Writing Committee Members; American College of Cardiology/American Heart Association Task Force. 2008. Focused update incorporated into the ACC/AHA 2006 guidelines for the management of patients with valvular heart disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 1998 Guidelines for the Management of Patients With Valvular Heart Disease): endorsed by the Society of Cardiovascular Anesthesiologists, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and Society of Thoracic Surgeons. *Circulation*, 118(15):e523-661.
- Borsi L, Balza E, Bestagno M, Castellani P, Carnemolla B, Biro A, Leprini A, Sepulveda J, Burrone O, Neri D, Zardi L. 2002. Selective targeting of tumoral vasculature: comparison of different formats of an antibody (L19) to the ED-B domain of fibronectin. *Int J Cancer*, 102(1):75-85.
- Bowers SL, Banerjee I, Baudino TA. 2010. The extracellular matrix: at the center of it all. *J Mol Cell Cardiol*, 48(3):474-482. Review.



- Brack SS, Silacci M, Birchler M, Neri D. 2006. Tumor-targeting properties of novel antibodies specific to the large isoform of tenascin-C. *Clin Cancer Res*, 12(10):3200-3208.
- Brilla CG, Reams GP, Maisch B, Weber KT. 1993. Renin-angiotensin system and myocardial fibrosis in hypertension: regulation of the myocardial collagen matrix. *Eur Heart J*, 14 Suppl J:57-61. Review.
- Brilla CG, Maisch B. 1994. Regulation of the structural remodelling of the myocardium: from hypertrophy to heart failure. *Eur Heart J*, 15 Suppl D:45-52. Review.
- Brown L. 2005. Cardiac extracellular matrix: a dynamic entity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 289(3):H973-4. Review.
- Butcher JT, Norris RA, Hoffman S, Mjaatvedt CH, Markwald RR. 2007. Periostin promotes atrioventricular mesenchyme matrix invasion and remodeling mediated by integrin signaling through Rho/PI 3-kinase. *Dev Biol*, 302(1):256-66.
- Carnemolla B, Borsi L, Balza E, Castellani P, Meazza R, Berndt A, Ferrini S, Kosmehl H, Neri D, Zardi L. 2002. Enhancement of the antitumor properties of interleukin-2 by its targeted delivery to the tumor blood vessel extracellular matrix. *Blood*, 99(5):1659-65.
- Casscells W, Kimura H, Sanchez JA, Yu ZX, Ferrans VJ. 1990. Immunohistochemical study of fibronectin in experimental myocardial infarction. *Am J Pathol*, 137(4):801-10.
- Chen H, Huang XN, Stewart AF, Sepulveda JL. 2004. Gene expression changes associated with fibronectin-induced cardiac myocyte hypertrophy. *Physiol Genomics*, 18(3):273-83.
- Chiquet-Ehrismann R. 1991. Anti-adhesive molecules of the extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol*, 3(5):800-4.
- Chiquet-Ehrismann R, Matsuoka Y, Hofer U, Spring J, Bernasconi C, Chiquet M. 1991. Tenascin variants: differential binding to fibronectin and distinct distribution in cell cultures and tissues. *Cell Regul*, 2(11):927-938.
- Chiquet-Ehrismann R. 2004. Tenascins. *Int J Biochem Cell Biol*, 36(6):986-990.
- Chung CY, Zardi L, Erickson HP. 1995. Binding of tenascin-C to soluble fibronectin and matrix fibrils. *J Biol Chem*, 270(48):29012-29017.
- Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. 2000. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol*, 35(3):569-82. Review.
- D'Agostino RB, Russell MW, Huse DM, Ellison RC, Silbershatz H, Wilson PW, Hartz SC. 2000. Primary and subsequent coronary risk appraisal: new results from the Framingham study. *Am Heart J*, 139(2 Pt 1):272-81.
- Dean RG, Balding LC, Candido R, Burns WC, Cao Z, Twigg SM, Burrell LM. 2005. Connective tissue growth factor and cardiac fibrosis after myocardial infarction. *J Histochem Cytochem*, 53(10):1245-1256.
- Dilley RJ, McGeachie JK, Prendergast FJ. 1987. A review of the proliferative behaviour, morphology and phenotypes of vascular smooth muscle. *Atherosclerosis*, 63(2-3):99-107.
- Ebbinghaus C, Ronca R, Kaspar M, Grabulovski D, Berndt A, Kosmehl H, Zardi L, Neri D. 2005. Engineered vascular-targeting antibody-interferon-gamma fusion protein for cancer therapy. *Int J Cancer*, 116(2):304-13.

- Ekblom M, Fassler R, Tomasini-Johansson B, Nilsson K, Ekblom P. 1993. Downregulation of tenascin expression by glucocorticoids in bone marrow stromal cells and in fibroblasts. *J Cell Biol*, 123(4):1037-1045.
- Eisenberg LM, Markwald RR. 1995. Molecular regulation of atrioventricular valvuloseptal morphogenesis. *Circ Res*, 77(1):1-6.
- Farhadian F, Contard F, Corbier A, Barrieux A, Rappaport L, Samuel JL. 1995. Fibronectin expression during physiological and pathological cardiac growth. *J Mol Cell Cardiol*, 27(4):981-90.
- Felkin LE, Lara-Pezzi E, George R, Yacoub MH, Birks EJ, Barton PJ. 2009. Expression of extracellular matrix genes during myocardial recovery from heart failure after left ventricular assist device support. *J Heart Lung Transplant*, 28(2):117-22.
- Fiechter M, Frey K, Fugmann T, Kaufmann PA, Neri D. 2011. Comparative in vivo analysis of the atherosclerotic plaque targeting properties of eight human monoclonal antibodies. *Atherosclerosis*, 214(2):325-30.
- Figulla L, Neumann A, Figulla HR, Kahlert P, Erbel R, Neumann T. 2011. Transcatheter aortic valve implantation: evidence on safety and efficacy compared with medical therapy. A systematic review of current literature. *Clin Res Cardiol*, 100(4):265-76.
- Franz M, Berndt A, Altendorf-Hofmann A, Fiedler N, Richter P, Schumm J, Fritzenwanger M, Figulla HR, Brehm BR. 2009. Serum levels of large tenascin-C, MMP-9 and TIMP-4 in concentric versus eccentric left ventricular hypertrophy. *Eur J Heart Fail*, 11(11):1057-62.
- Franz M, Berndt A, Grün K, Richter P, Kosmehl H, Neri D, Gummert J, Figulla HR, Brehm BR, Renner A. 2011. Expression of extra domain A containing fibronectin in chronic cardiac allograft rejection. *J Heart Lung Trans*, 30(1):86-94.
- Franz M, Grün K, Richter P, Brehm BR, Fritzenwanger M, Hekmat K, Neri D, Gummert J, Figulla HR, Kosmehl H, Berndt A, Renner A. 2010. Extra cellular matrix remodelling after heterotopic rat heart transplantation: gene expression profiling and involvement of ED-A+ fibronectin, alpha-smooth muscle actin and B+ tenascin-C in chronic cardiac allograft rejection. *Histochem Cell Biol*, 134(5):503-17.
- Franz M, Brehm BR, Richter P, Grün K, Neri D, Kosmehl H, Hekmat K, Renner A, Gummert J, Figulla HR, Berndt A. 2010. Changes in extra cellular matrix remodelling and re-expression of fibronectin and tenascin-C splicing variants in human myocardial tissue of the right atrial auricle: implications for a targeted therapy of cardiovascular diseases using human SIP format antibodies. *J Mol Histol*, 41(1):39-50.
- Gabrielsen A, Lawler PR, Yongzhong W, Steinbruchel D, Blagoja D, Paulsson-Berne G, Kastrup J, Hansson GK. 2007. Gene expression signals involved in ischemic injury, extracellular matrix composition and fibrosis defined by global mRNA profiling of the human left ventricular myocardium. *J Mol Cell Cardiol*, 42(4):870-883.
- George EL, Baldwin HS, Hynes RO. 1997. Fibronectins are essential for heart and blood vessel morphogenesis but are dispensable for initial specification of precursor cells. *Blood*, 90(8):3073-3081.
- Glukhova MA, Frid MG, Shekhonin BV, Vasilevskaya TD, Grunwald J, Saginati M, Koteliansky VE. 1989. Expression of extra domain A fibronectin sequence in vascular smooth muscle cells is phenotype dependent. *J Cell Biol*, 109(1):357-366.

- Graham HK, Horn M, Trafford AW. 2008. Extracellular matrix profiles in the progression to heart failure. European Young Physiologists Symposium Keynote Lecture-Bratislava 2007. *Acta Physiol (Oxf)*, 194(1):3-21. Review.
- Hein S, Schaper J. 2001. The extracellular matrix in normal and diseased myocardium. *J Nucl Cardiol*, 8(2):188-96.
- Hein S, Arnon E, Kostin S, Schönburg M, Elsässer A, Polyakova V, Bauer EP, Klövekorn WP, Schaper J. 2003. Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure-overloaded human heart: structural deterioration and compensatory mechanisms. *Circulation*, 107(7):984-91.
- Hessel MH, Bleeker GB, Bax JJ, Henneman MM, den Adel B, Klok M, Schalij MJ, Atsma DE, van der Laarse A. 2007. Reverse ventricular remodelling after cardiac resynchronization therapy is associated with a reduction in serum tenascin-C and plasma matrix metalloproteinase-9 levels. *Eur J Heart Fail*, 9(10):1058-1063.
- Hessel M, Steendijk P, den Adel B, Schutte C, van der Laarse A. 2009. Pressure overload-induced right ventricular failure is associated with re-expression of myocardial tenascin-C and elevated plasma tenascin-C levels. *Cell Physiol Biochem*, 24(3-4):201-10.
- Huang JX, Potts JD, Vincent EB, Weeks DL, Runyan RB. 1995. Mechanisms of cell transformation in the embryonic heart. *Ann N Y Acad Sci*, 752:317-330. Review.
- Hynes RO. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 110(6):673-687.
- Imanaka-Yoshida K, Hiroe M, Nishikawa T, Ishiyama S, Shimojo T, Ohta Y, Sakakura T, Yoshida T. 2001. Tenascin-C modulates adhesion of cardiomyocytes to extracellular matrix during tissue remodeling after myocardial infarction. *Lab Invest*, 81(7):1015-1024.
- Imanaka-Yoshida K, Hiroe M, Yasutomi Y, Toyozaki T, Tsuchiya T, Noda N, Maki T, Nishikawa T, Sakakura T, Yoshida T. 2002. Tenascin-C is a useful marker for disease activity in myocarditis. *J Pathol*, 197(3):388-394.
- Imanaka-Yoshida K, Matsumoto K, Hara M, Sakakura T, Yoshida T. 2003. The dynamic expression of tenascin-C and tenascin-X during early heart development in the mouse. *Differentiation*, 71(4-5):291-298.
- Imanaka-Yoshida K, Hiroe M, Yoshida T. 2004. Interaction between cell and extracellular matrix in heart disease: multiple roles of tenascin-C in tissue remodeling. *Histol Histopathol*, 19(2):517-525.
- Iwamoto M, Hirohata S, Ogawa H, Ohtsuki T, Shinohata R, Miyoshi T, Hatipoglu FO, Kusachi S, Yamamoto K, Ninomiya Y. 2010. Connective tissue growth factor induction in a pressure-overloaded heart ameliorated by the angiotensin II type 1 receptor blocker olmesartan. *Hypertens Res*, 33(12):1305-11.
- Karpuzoglu OE, Ozay B, Sener T, Aydin NB, Ketenci B, Aksu T, Gercekoglu H, Demirtas M. Comparison of minimally invasive direct coronary artery bypass and off-pump coronary artery bypass in single-vessel disease. 2009. *Heart Surg Forum*, 12(1):E39-43.
- Kim H, Yoon CS, Rah B. 1999. Expression of extracellular matrix components fibronectin and laminin in the human fetal heart. *Cell Struct Funct*, 24(1):19-26.
- Kodali SK, O'Neill WW, Moses JW, Williams M, Smith CR, Tuzcu M, Svensson LG, Kapadia S, Hanzel G, Kirtane AJ, Leon MB. Am J Cardiol. 2011. Early and Late (One Year) Outcomes Following Transcatheter Aortic Valve Implantation in Patients With Severe Aortic Stenosis (from the United States REVIVAL Trial), 107(7):1058-64.

- Koitabashi N, Arai M, Niwano K, Watanabe A, Endoh M, Suguta M, Yokoyama T, Tada H, Toyama T, Adachi H, Naito S, Oshima S, Nishida T, Kubota S, Takigawa M, Kurabayashi M. 2008. Plasma connective tissue growth factor is a novel potential biomarker of cardiac dysfunction in patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail*, 10(4):373-379.
- Kosmehl H, Berndt A, Katenkamp D. 1996. Molecular variants of fibronectin and laminin: structure, physiological occurrence and histopathological aspects. *Virchows Arch*, 429(6):311-322.
- Leask A. 2010. Potential therapeutic targets for cardiac fibrosis: TGFbeta, angiotensin, endothelin, CCN2, and PDGF, partners in fibroblast activation. *Circ Res*, 106(11):1675-1680.
- Libby P, Theroux P. 2005. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation*, 111(25):3481-8. Review.
- Lindsey ML. 2004. MMP induction and inhibition in myocardial infarction. *Heart Fail Rev*, 9(1):7-19.
- Lukashev ME, Werb Z. 1998. ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. *Trends Cell Biol*, 8(11):437-41.
- Matsushita T, Oyamada M, Fujimoto K, Yasuda Y, Masuda S, Wada Y, Oka T, Takamatsu T. 1999. Remodeling of cell-cell and cell-extracellular matrix interactions at the border zone of rat myocardial infarcts. *Circ Res*, 85(11):1046-55.
- Mackie EJ, Halfter W, Liverani D. 1988. Induction of tenascin in healing wounds. *J Cell Biol*, 107(6 Pt 2):2757-2767.
- Mighell AJ, Thompson J, Hume WJ, Markham AF, Robinson PA. 1997. Human tenascin-C: identification of a novel type III repeat in oral cancer and of novel splice variants in normal, malignant and reactive oral mucosae. *Int J Cancer*, 72(2):236-240.
- Mitchell RN. 2009. Graft vascular disease: immune response meets the vessel wall. *Annu Rev Pathol*, 4:19-47.
- Morimoto S, Imanaka-Yoshida K, Hiramitsu S, Kato S, Ohtsuki M, Uemura A, Kato Y, Nishikawa T, Toyozaki T, Hishida H, Yoshida T, Hiroe M. 2005. Diagnostic utility of tenascin-C for evaluation of the activity of human acute myocarditis. *J Pathol*, 205(4):460-467.
- Mujumdar VS, Smiley LM, Tyagi SC. 2001. Activation of matrix metalloproteinase dilates and decreases cardiac tensile strength. *Int J Cardiol*, 79(2-3):277-86.
- Murphy-Ullrich JE, Lightner VA, Aukhil I, Yan YZ, Erickson HP, Hook M. 1991. Focal adhesion integrity is downregulated by the alternatively spliced domain of human tenascin. *J Cell Biol*, 115(4):1127-1136.
- Nieminen MS, Böhm M, Cowie MR, Drexler H, Filippatos GS, Jondeau G, Hasin Y, Lopez-Sendon J, Mebazaa A, Metra M, Rhodes A, Swedberg K, Priori SG, Garcia MA, Blanc JJ, Budaj A, Cowie MR, Dean V, Deckers J, Burgos EF, Lekakis J, Lindahl B, Mazzotta G, Morais J, Oto A, Smiseth OA, Garcia MA, Dickstein K, Albuquerque A, Conthe P, Crespo-Leiro M, Ferrari R, Follath F, Gavazzi A, Janssens U, Komajda M, Morais J, Moreno R, Singer M, Singh S, Tendera M, Thygesen K; ESC Committee for Practice Guideline (CPG). 2005. Executive summary of the guidelines on the diagnosis and treatment of acute heart failure: the Task Force on Acute Heart Failure of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J*, 26(4):384-416.
- Norton GR, Tsotetsi J, Trifunovic B, Hartford C, Candy GP, Woodiwiss AJ. 1997. Myocardial stiffness is attributed to alterations in cross-linked collagen rather than total collagen or phenotypes in spontaneously hypertensive rats. *Circulation*, 96(6):1991-8.

- Orend G, Chiquet-Ehrismann R. 2000. Adhesion modulation by antiadhesive molecules of the extracellular matrix. *Exp Cell Res*, 261(1):104-110.
- Pedretti M, Rancic Z, Soltermann A, Herzog BA, Schliemann C, Lachat M, Neri D, Kaufmann PA. 2010. Comparative immunohistochemical staining of atherosclerotic plaques using F16, F8 and L19: Three clinical-grade fully human antibodies. *Atherosclerosis*, 208(2):382-9. Epub 2009 Jul 30.
- Pelouch V, Dixon IM, Golfman L, Beamish RE, Dhalla NS. 1993. Role of extracellular matrix proteins in heart function. *Mol Cell Biochem*, 129(2):101-20. Review.
- Polyakova V, Hein S, Kostin S, Ziegelhoeffer T, Schaper J. 2004. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in pressure-overloaded human myocardium during heart failure progression. *J Am Coll Cardiol*, 44(8):1609-1618.
- Potts JR, Campbell ID. 1996. Structure and function of fibronectin modules. *Matrix Biol*, 15(5):313-20; discussion 321.
- Rybak JN, Trachsel E, Scheuermann J, Neri D. 2007. Ligand-based vascular targeting of disease. *ChemMedChem* 2(1):22-40.
- Samuel JL, Farhadian F, Sabri A, Marotte F, Robert V, Rappaport L. 1994. Expression of fibronectin during rat fetal and postnatal development: an in situ hybridisation and immunohistochemical study. *Cardiovasc Res*, 28(11):1653-1661.
- Schliemann C, Neri D. 2010. Antibody-based vascular tumor targeting. *Recent Results Cancer Res*, 180:201-16.
- Schwager K, Kaspar M, Bootz F, Marcolongo R, Paresce E, Neri D, Trachsel E. 2009. Preclinical characterization of DEKAVIL (F8-IL10), a novel clinical-stage immunocytokine which inhibits the progression of collagen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther*, 11(5):R142.
- Schwarzbauer JE. 1991. Alternative splicing of fibronectin: three variants, three functions. *Bioessays*, 13(10):527-33.
- Serini G, Bochaton-Piallat ML, Ropraz P, Geinoz A, Borsi L, Zardi L, Gabbiani G. 1998. The fibronectin domain ED-A is crucial for myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor-beta1. *J Cell Biol*, 142(3):873-881.
- Serini G, Gabbiani G. 1999. Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation. *Exp Cell Res*, 250(2):273-283.
- Siri A, Carnemolla B, Saginati M, Leprini A, Casari G, Baralle F, Zardi L. 1991. Human tenascin: primary structure, pre-mRNA splicing patterns and localization of the epitopes recognized by two monoclonal antibodies. *Nucleic Acids Res*, 19(3):525-531.
- Siri A, Knauper V, Veirana N, Caocci F, Murphy G, Zardi L. 1995. Different susceptibility of small and large human tenascin-C isoforms to degradation by matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*, 270(15):8650-8654.
- Spinale FG. 2007. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiol Rev*, 87(4):1285-342.
- Sridurongrit S, Larsson J, Schwartz R, Ruiz-Lozano P, Kaartinen V. 2008. Signaling via the Tgf-beta type I receptor Alk5 in heart development. *Dev Biol*, 322(1):208-18.

- Subramanian SV, Kelm RJ, Polikandriotis JA, Orosz CG, Strauch AR. 2002. Reprogramming of vascular smooth muscle alpha-actin gene expression as an early indicator of dysfunctional remodeling following heart transplant. *Cardiovasc Res*, 54(3):539-548.
- Swynghedauw B. 1999. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev*, 79(1):215-62. Review.
- Statistisches Bundesamt Deutschland. 2011. Sterbefälle nach den 10 häufigsten Todesursachen insgesamt und nach Geschlecht 2009. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden.
- Tamaoki M, Imanaka-Yoshida K, Yokoyama K, Nishioka T, Inada H, Hiroe M, Sakakura T, Yoshida T. 2005. Tenascin-C regulates recruitment of myofibroblasts during tissue repair after myocardial injury. *Am J Pathol*, 167(1):71-80.
- Terasaki F, Okamoto H, Onishi K, Sato A, Shimomura H, Tsukada B, Imanaka-Yoshida K, Hiroe M, Yoshida T, Kitaura Y, Kitabatake A. 2007. Higher serum tenascin-C levels reflect the severity of heart failure, left ventricular dysfunction and remodeling in patients with dilated cardiomyopathy. *Circ J* 71(3):327-330.
- Trachsel E, Neri D. 2006. Antibodies for angiogenesis inhibition, vascular targeting and endothelial cell transcytosis. *Adv Drug Deliv Rev*, 58(5-6):735-754.
- Tucker RP, Spring J, Baumgartner S, Martin D, Hagios C, Poss PM, Chiquet-Ehrismann R. 1994. Novel tenascin variants with a distinctive pattern of expression in the avian embryo. *Development*, 120(3):637-647.
- Vahanian A, Baumgartner H, Bax J, Butchart E, Dion R, Filippatos G, Flachskampf F, Hall R, Iung B, Kasprzak J, Nataf P, Tornos P, Torracca L, Wenink A. 2007. Guidelines on the management of valvular heart disease: The Task Force on the Management of Valvular Heart Disease of the European Society of Cardiology. ESC Committee for Practice Guidelines. *Eur Heart J*, 28(2):230-68.
- Villa CH, McDevitt MR, Escorcia FE, Rey DA, Bergkvist M, Batt CA, Scheinberg DA. 2008. Synthesis and Biodistribution of Oligonucleotide-Functionalized, Tumor-Targetable Carbon Nanotubes. *Nano Lett*, 8(12):4221-8.
- Villa A, Trachsel E, Kaspar M, Schliemann C, Sommariva R, Rybak JN, Rösli C, Borsi L, Neri D. 2008. A high-affinity human monoclonal antibody specific to the alternatively spliced EDA domain of fibronectin efficiently targets tumor neo-vasculature in vivo. *Int J Cancer*, 122(11):2405-13.
- Weber KT. 1989. Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. *J Am Coll Cardiol*, 13(7):1637-52.
- Weber KT, Brilla CG. 1991. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation*. 83(6):1849-65. Review.
- Weber KT. 2004. From inflammation to fibrosis: a stiff stretch of highway. *Hypertension*, 43(4):716-719.
- Wijns W, Kolh P, Danchin N, Di Mario C, Falk V, Folliguet T, Garg S, Huber K, James S, Knuuti J, Lopez-Sendon J, Marco J, Menicanti L, Ostojic M, Piepoli MF, Pirllet C, Pomar JL, Reifart N, Ribichini FL, Schalij MJ, Sergeant P, Serruys PW, Silber S, Sousa Uva M, Taggart D; ESC Committee for Practice Guidelines, Vahanian A, Auricchio A, Bax J, Ceconi C, Dean V, Filippatos G, Funck-Brentano C, Hobbs R, Kearney P, McDonagh T, Popescu BA, Reiner Z, Sechtem U, Sirnes PA, Tendera M, Vardas PE, Widimsky P; EACTS Clinical Guidelines Committee, Kolh P, Alfieri O, Dunning J, Elia S, Kappetein P, Lockowandt U, Sarris G, Vouhe P, Kearney P, von Segesser L, Agewall S, Aladashvili A, Alexopoulos D, Antunes MJ, Atalar E,

Brutel de la Riviere A, Doganov A, Eha J, Fajadet J, Ferreira R, Garot J, Halcox J, Hasin Y, Janssens S, Kervinen K, Laufer G, Legrand V, Nashef SA, Neumann FJ, Niemela K, Nihoyannopoulos P, Noc M, Piek JJ, Pirk J, Rozenman Y, Sabate M, Starc R, Thielmann M, Wheatley DJ, Windecker S, Zembala M. 2010. Guidelines on myocardial revascularization: The Task Force on Myocardial Revascularization of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). *Eur Heart J*, 31(20):2501-55.

Willems IE, Arends JW, Daemen MJ. 1996. Tenascin and fibronectin expression in healing human myocardial scars. *J Pathol*, 179(3):321-5.

Yang DC, Ma ST, Tan Y, Chen YH, Li D, Tang B, Chen JS, Su XH, Li G, Zhang X, Yang YJ. 2010. Imbalance of matrix metalloproteinases/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and loss of fibronectin expression in patients with congestive heart failure. *Cardiology*, 116(2):133-141.

Zahn R, Gerckens U, Grube E, Linke A, Sievert H, Eggebrecht H, Hambrecht R, Sack S, Hauptmann KE, Richardt G, Figulla HR, Senges J; German Transcatheter Aortic Valve Interventions-Registry Investigators. 2011. Transcatheter aortic valve implantation: first results from a multi-centre real-world registry. *Eur Heart J*, 32(2):198-204.

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Anja Baldinger, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

- Prof. Dr. Alexander Berndt
- Dr. Marcus Franz
- Prof. Dr. Hartwig Kosmehl
- Prof. Dr. Dario Neri

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift

---



## Lebenslauf

### PERSÖNLICHE DATEN

---

Name: Anja Baldinger  
Anschrift: August-Bebel-Str. 27a, 07743 Jena  
Geburtsdatum: 07.08.1982  
Geburtsort: Vöcklabruck / Österreich  
Staatsangehörigkeit: Österreich

### AUSBILDUNG

---

1988 - 1992 Volksschule Lenzing  
1992 - 2000 Bundesgymnasium Vöcklabruck  
1998 3-Mon. Aufenthalt an der Highschool Dorset College in Vancouver/Kanada  
06/2000 Matura  
2000 - 2005 Medizinstudium an der Universität Wien, Promotion am 23.12.2005

### BERUFSTÄTIGKEITEN

---

Aug. 2000 Pflegehelferin im Alten- und Pflegeheim Lenzing  
Jul. 2001 Qualitätssicherung im Analyt-Labor der Lenzing AG  
Jul. 02 Archivierung von Patenten und wissenschaftlicher Literatur in der wissenschaftlichen Bibliothek der Lenzing AG  
Feb. 05 – Jun. 06 Wissenschaftliche Mitarbeit am Laboratorium für Chirurgische Funktionsdiagnostik der Univ. Klinik f. für Chirurgie, Wien  
Jun. 06 – Dez. 08 Assistenzärztin an der Univ. Klinik f. Strahlentherapie des Allgemeinen Krankenhauses Wien  
Jan. 09 – dato Assistenzärztin an der Klinik f. Innere Medizin I des Universitätsklinikums Jena

Ort, Datum

Unterschrift

---

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich insbesondere bei apl. Prof. Dr. Alexander Berndt (Leiter der AG „Extrazelluläre Matrix“ am Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Jena) für die Möglichkeit an seinem Labor zu promovieren und die stets angenehme Zusammenarbeit bedanken. Als mein Doktorvater hat er den gesamten Entstehungsprozess der vorliegenden Arbeit begleitet und stand mir bei Problemen oder Fragen jederzeit unterstützend zur Seite.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. med. Marcus Franz (Klinik für Innere Medizin I, Universitätsklinikum Jena), durch dessen wissenschaftliche Vorarbeit die Idee zu der vorliegenden Studie überhaupt erst aufkam, für die Überlassung des Themas. Insbesondere möchte ich mich bei ihm auch für die Einführung in die praktische Laborarbeit und die Unterstützung bei der Verfassung der Promotionsschrift bedanken und hoffe, auf eine Fortsetzung der freundschaftlichen Zusammenarbeit bei zukünftigen Projekten.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Hans Reiner Figulla (Direktor der Klinik für Innere Medizin I, Universitätsklinikum Jena), der mein Promotionsvorhaben stets wohlwollend und mit konstruktiver Kritik unterstützt hat.

Ich danke Herrn apl. Prof. Dr. med. Bernhard R. Brehm, MBA (Klinik für Innere Medizin I, Universitätsklinikum Jena) für die intensive Unterstützung unseres Forschungsprojektes, insbesondere für die Schaffung der organisatorischen und logistischen Voraussetzungen für die Asservierung des Gewebematerials.

Bei Herrn Prof. Dr. Iver Petersen (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Jena) möchte ich mich herzlich für die Möglichkeit bedanken, die Einrichtungen seines Instituts zur Durchführung der experimentellen Untersuchungen zu nutzen.

Herrn Univ.-Professor Dr. med. Khosro Hekmat und Herrn Dr. med. Torsten Bossert (Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie, Universitätsklinikum Jena) möchte ich herzlich für die Bereitstellung der humanen Myokardgewebeproben danken.

---

Des Weiteren danke ich Herrn Univ.-Professor Dr. med. Hartwig Kosmehl (Institut für Pathologie, HELIOS-Klinikum Erfurt) für die Unterstützung bei der histologischen Bewertung der Präparate.

Herrn Professor Dr. Dario Neri (Institut für Pharmazeutische Wissenschaften, ETH Zürich) sei für das unentgeltliche Überlassen der humanen rekombinanten Antikörper gedankt.

Die zum Gelingen dieser Promotion notwendigen finanziellen Unterstützungen erhielt ich im Rahmen des EU-Projektes ADAMANT (Health-F2-2008-201342) sowie von der Friedrich-Schiller-Universität Jena.

Nicht zuletzt möchte ich meinem Freund Bernhard für sein Verständnis für die meinerseits im pathologischen Institut verbrachten Abende und seine moralische Unterstützung danken, ohne welche die Anfertigung der Arbeit nicht möglich gewesen wäre.